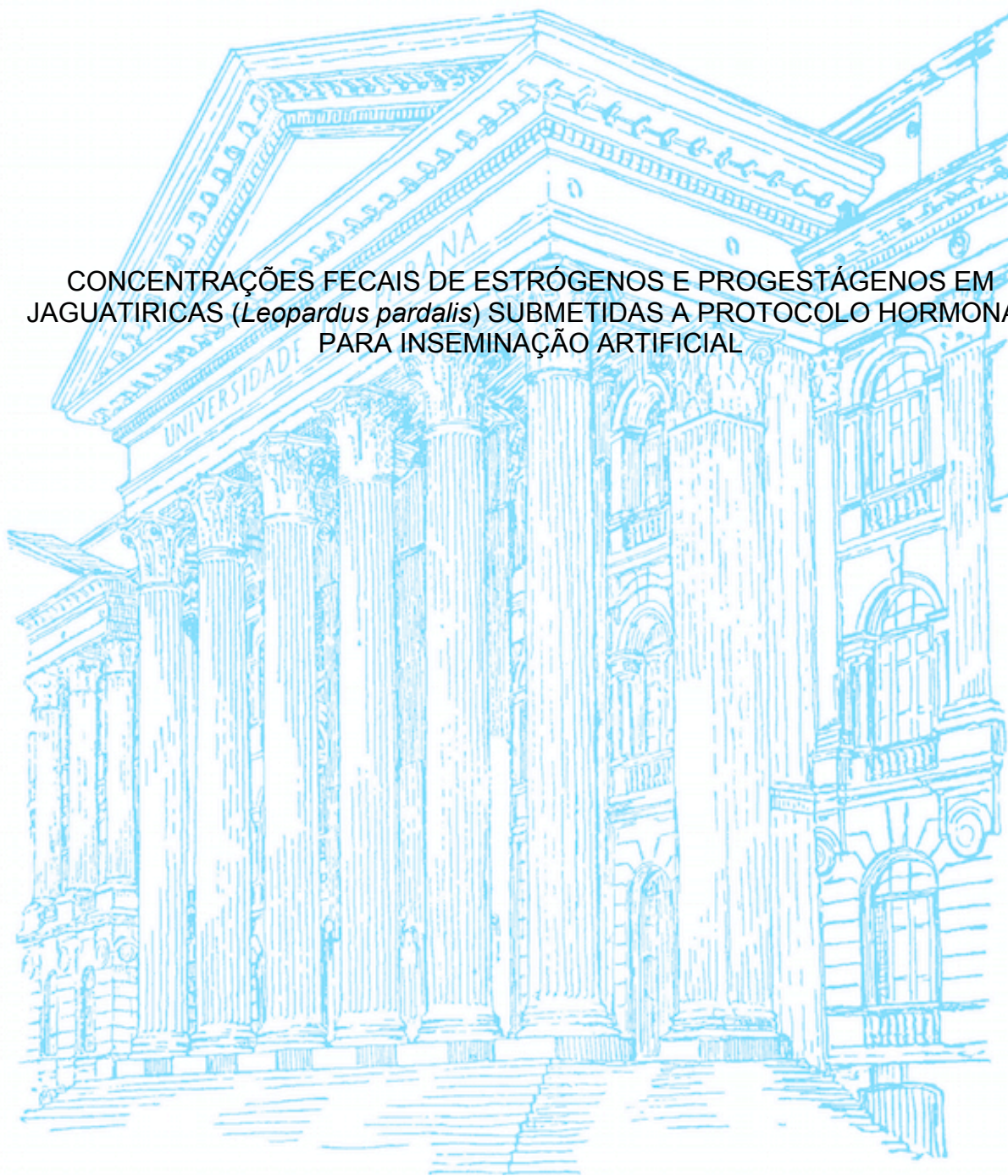


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCISNEI LUIZ ZIMMERMANN

CONCENTRAÇÕES FECAIS DE ESTRÓGENOS E PROGESTÁGENOS EM
JAGUATIRICAS (*Leopardus pardalis*) SUBMETIDAS A PROTOCOLO HORMONAL
PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL



CURITIBA
2012

MARCISNEI LUIZ ZIMMERMANN

CONCENTRAÇÕES FECAIS DE ESTRÓGENOS E PROGESTÁGENOS EM
JAGUATIRICAS (*Leopardus pardalis*) SUBMETIDAS A PROTOCOLO HORMONAL
PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas área de concentração Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Nei Moreira

CURITIBA
2012

Termo de aprovação

CONCENTRAÇÕES FECAIS DE ESTRÓGENOS E PROGESTÁGENOS EM
JAGUATIRICAS (*Leopardus pardalis*) SUBMETIDAS A PROTOCOLO HORMONAL
PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

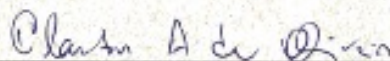
por

Marcisnei Luiz Zimmermann

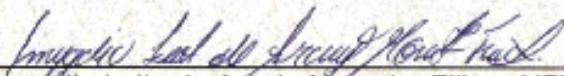
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia, no Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Dr. Nei Moreira - UFPR
Presidente e Orientador



Dr. Claudio Alvarenga de Oliveira - USP



Dr. Emygdio Leite de Araujo Monteiro Filho - UFPR

Curitiba, 23 de agosto de 2012.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me deu forças para superar todos os desafios da vida;

Ao meu orientador e amigo, Nei Moreira, pela paciência, dedicação e pela orientação nos caminhos da ciência, possibilitando mais essa vitória em minha vida;

Aos meus pais Hilmar e Inês de Fátima Zimmermann, pelo apoio, incentivo, amor e carinho durante os anos de minha vida, principalmente nas dificuldades;

A minha namorada Marlene Livia Toderke, por me apoiar e sempre estar ao meu lado nos momentos de cansaço e de alegria;

Ao médico veterinário e amigo Renato Herdina Erdmann, que sempre esteve à disposição e pela ajuda indispensável nas atividades deste projeto;

Aos meus amigos e companheiros de trabalho, Marcel Henrique Blank e Rodrigo Neca Ribeiro, pelos momentos de trabalho, discussão e alegria durante o trabalho;

A toda equipe de tratadores do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional, pelo auxílio nas coletas e por sempre estarem dispostos a tirar nossas dúvidas em relação ao manejo dos animais;

Ao biólogo Marcos José de Oliveira, por toda ajuda e dedicação, para a realização do projeto;

Ao médico veterinário Zalmir Silvino Cubas, pela ajuda, ideias, debates e pelo esforço em manter os animais sempre em boas condições de saúde;

Ao médico veterinário Wanderlei de Moraes pela ajuda com a videolaparoscopia e incentivo e apoio ao projeto;

Ao bioquímico Alex Evangelista do Amaral pela ajuda no laboratório;

À biomédica Dra. Tatiane Funari Chrusciak, por ceder o laboratório e colocar-se à disposição para ajudar a esclarecer nossas dúvidas;

À Dra. Priscila Furtado Viau, pela ajuda nos conselhos e por ter nos recebido muito bem para um estágio na USP.

Aos meus estimados amigos Murilo Zanetti Marochi, Luiz Roberto Francisco, Thiago Silvestre, Mariana Lacerda, pela ajuda e companheirismo na minha estadia na cidade de Curitiba;

Aos amigos e colegas de turma da Pós-Graduação, por momentos de discussão e descontração;

Aos Professores da Pós-Graduação em Zoologia da Universidade Federal do Paraná;

A todos que, de alguma forma, apoiaram e contribuíram com este projeto.

“Este trabalho é dedicado a todos
que, de alguma forma, lutam para
a conservação da natureza”

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
OBJETIVOS	xii
OBJETIVO GERAL	xii
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO GERAL	1
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
CONSERVAÇÃO E REPRODUÇÃO DE PEQUENOS FELINOS EM CATIVEIRO	
– UMA REVISÃO	3
1.1 CONSERVAÇÃO DAS ESPÉCIES	3
1.2 FISIOLOGIA REPRODUTIVA DE FELÍDEOS.....	6
1.3 USO DE GONADOTROPINAS EXÓGENAS.....	8
1.4 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM FELÍDEOS	11
1.5 MONITORAMENTO HORMONAL NÃO INVASIVO	13
2. REFERÊNCIAS	14
3. CONCENTRAÇÕES FECAIS DE ESTRÓGENOS E PROGESTÁGENOS EM	
JAGUATIRICAS (<i>Leopardus pardalis</i>) SUBMETIDAS A PROTOCOLO	
HORMONAL PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.....	20
RESUMO	20
ABSTRACT.	21
Key-words:.....	21
4. INTRODUÇÃO	22
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5.1.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO E ANIMAIS	25
5.2.1 CONTENÇÃO FÍSICA E PROTOCOLO ANESTÉSICO.....	26
5.3.1 TRATAMENTO HORMONAL.....	27
5.4.1 SÊMEN	28

5.5.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL	29
5.6.1 AMOSTRAS FECAIS.....	30
5.7.1 ANÁLISE DE METABÓLITOS FECAIS	30
4.8.1 ANÁLISE DE DADOS.....	32
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6.1.1. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA OVARIANA POR VIDEOLAPAROSCOPIA..	34
6.2.1. DOSAGENS HORMONAIS	35
7. CONCLUSÕES	48
8. REFERÊNCIAS	49

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mapa de distribuição do gênero *Leopardus* para a América, (A) jaguatirica (*L. pardalis*), (B) gato-maracajá (*L. wiedii*), (C) gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*), (D) gato palheiro (*L. colocolo*), (E) gato-do-mato-grande (*L. geoffroyi*) – Adaptado de Sunquist e Sunquist, 2002..... 5
- Figura 2. (A) Vista interna de um recinto; (B) Vista lateral de um recinto para jaguatiricas no CASIB..... 26
- Figura 3. (A) Biotério localizado no CASIB; (B e C) Cozinha onde eram separados os alimentos que foram fornecidos aos animais..... 26
- Figura 4. (A) Jaguatirica contida fisicamente com auxílio de puçá; (B) Animal já sedado e sendo transportado para o Hospital Veterinário do Refúgio Biológico Bela Vista da Itaipu Binacional..... 27
- Figura 5. Com o animal sedado (A) é realizada a depilação do local do implante e realizada antissepsia local; (B e C) Com o aplicador, é feita a inserção do implante; (D) Término da aplicação do implante..... 28
- Figura 6. Animal sedado (A) animal com a tricotomia realizada na região ventral; (B) Animal posicionado para o início do procedimento cirúrgico; (C) animal sendo monitorado por equipamento multiparamétrico após a inserção do implante. 29
- Figura 7. Perfis de estrógenos (ng/g) e progestágenos (µg/g) fecais em uma fêmea controle de jaguatirica (*L. pardalis*) não submetida ao protocolo de inseminação artificial..... 36
- Figura 8. Perfis de metabólitos de estrógenos (ng/g) e progestágenos (µg/g) para a fêmea Lp 1897, antes, durante e após o protocolo de inseminação artificial. 37
- Figura 9. Perfil de metabólitos de estrógenos (ng/g) e progestágenos (µg/g) para a fêmea Lp 2322, antes, durante e após o protocolo de Inseminação artificial..... 38
- Figura 10. Perfil de metabólitos de estrógenos (ng/g) e progestágenos (µg/g) para a fêmea Lp 2417, antes, durante e após o protocolo de Inseminação artificial..... 38
- Figura 11. Perfil de metabólitos de estrógenos (ng/g) e progestágenos (µg/g) para a fêmea Lp 2428, antes, durante e após o protocolo de Inseminação artificial..... 39
- Figura 12 Representação gráfica das diferenças entre médias de estrógenos com ênfase entra a fase normal e a implantada. *Representa diferença significativa entre as fases para $p>0,05$ 40
- Figura 13. Médias e erros-padrão das concentrações de metabólitos de estrógenos entre as fases do estudo para a fêmea Lp 1897. O gráfico demonstra diferença entre Normal e Implante (0,0048)..... 41

- Figura 14. Médias e erros-padrão das concentrações de metabólitos de estrógenos entre as fases do estudo para a fêmea Lp 2322. Apesar de apresentar diferença no gráfico entre Normal e Implante, o teste indica igualdade ($p=0,2771$) entre as fases ($p>0,05$). 42
- Figura 15. Médias e erros-padrão das concentrações de metabólitos de estrógenos entre as fases do estudo para a fêmea Lp 2417. Indica a igualdade entre as fases ($p=0,1280$) ($p>0,05$). 42
- Figura 16. Médias e erros-padrão das concentrações de metabólitos de estrógenos entre as fases do estudo para a fêmea Lp 2428. Demonstrando que não há diferença significativa ($p=0,5895$) entre as médias ($p>0,05$). 43
- Figura 17. Médias e erros-padrão das concentrações de metabólitos de progestágenos entre as fases do estudo para a fêmea Lp 1897. O gráfico demonstra diferença entre Implante e Após IA (0,0177). 44
- Figura 18. Médias e erros-padrão das concentrações de metabólitos de progestágenos entre as fases do estudo para a fêmea Lp 2322. O gráfico demonstra diferença entre Implante e Após IA (0,0083). 44
- Figura 19. Médias e erros-padrão das concentrações de metabólitos de progestágenos entre as fases do estudo para a fêmea Lp 2417. O gráfico demonstra diferença entre Implante e Após IA (0,0013). 45
- Figura 20. Médias e erros-padrão das concentrações de metabólitos de progestágenos entre as fases do estudo para a fêmea Lp 2417. Demonstrando que não há diferença significativa ($p=0,1325$) entre as médias ($p>0,05$). 45
- Figura 21. Médias das concentrações basais de metabólitos de estrógenos entre a fase normal e Implante. * Demonstrando diferença significativa entre as médias ($p=0,0051$) ($p<0,05$). 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações gerais sobre as fêmeas de jaguatirica utilizadas no experimento.....	26
Tabela 2 - Resposta ovariana ao protocolo de indução ovariana por visualização através de videolaparoscopia.....	34
Tabela 3 - Médias das concentrações de metabólitos fecais de estradiol e progesterona, antes, durante e após o protocolo hormonal para inseminação artificial (IA), com ênfase para a fase anterior e com o implante de etonogestrel.....	35
Tabela 4 - Médias das concentrações de metabólitos fecais de progesterona, durante a fase de implante e após o protocolo de inseminação artificial (IA), valores com * indicam diferença (p<0,05) significativa entre fases.....	44
Tabela 5 - Concentração basal (média \pm EPM) de metabólitos fecais de estrógenos e progestágenos, por fêmea, para as jaguatiricas do experimento.....	44

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar os níveis de estrógenos e progestágenos antes, durante e após a aplicação de protocolo hormonal para inseminação artificial (IA) em jaguatiricas (*L. pardalis*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar se as mudanças nas concentrações de estrógenos e progestágenos após a indução artificial do desenvolvimento folicular e ovulação são próximas ao padrão natural da espécie;

Caracterizar os perfis de estrógenos e progestágenos durante o ciclo estral natural em jaguatiricas;

LISTA DE ABREVIATURAS

CASIB – Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional;

CV – coeficiente de variação;

IA – inseminação artificial;

Lp – *Leopardus pardalis*;

min – minutos;

MS – Mato Grosso do Sul;

ng/g – nanogramas por grama;

RPM – rotações por minuto;

µl – microlitros;

µg/g – microgramas por grama;

°C – graus Celsius;

± - mais ou menos.

RESUMO GERAL

Evitar maiores perdas de biodiversidade é desafio para várias instituições de pesquisa, criadouros conservacionistas, zoológicos e aquários, o crescimento econômico exige cada vez mais a necessidade de expandir a produção tanto industrial quanto agrícola, este crescimento por sua vez acaba por afetar diretamente a biodiversidade. A poluição, o desmatamento, a caça e exploração ilegal de áreas protegidas interferem diretamente nos processos biológicos fragmentando as paisagens e tornando áreas contínuas em mosaicos formados por ilhas florestais, impedindo o fluxo genético entre estes fragmentos. Assim uma saída para esta perda progressiva da biodiversidade é a reprodução em cativeiro. Com intuito de compreender a dinâmica dos processos ovarianos de pequenos felinos, foi realizado o monitoramento hormonal não invasivo de cinco fêmeas de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) (n=5) submetidas ao protocolo de inseminação artificial. Utilizou-se etonogestrel (Implanon®, Indústria da Organon Brasil e do comércio, São Paulo - SP), fabricado para uso humano, para interromper o processo da atividade ovariana de fêmeas de jaguatirica. Para as dosagens hormonais fecais, foram utilizados kits comerciais para estradiol (DRG® Estradiol ELISA - EIA-2693) e progesterona (DRG® progesterona ELISA - EIA-1561). Verificou-se uma significativa diminuição na atividade ovariana durante o período de implante, mostrando uma diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste não paramétrico de Mann-Whitney, estrógenos diminuíram suas concentrações de $1950,69 \pm 709,88$ ng/g para $692,33 \pm 275,14$ ng/g ($p=0,0051$) e as concentrações de progestágenos aumentaram de $5,57 \pm 1,5$ mg/g para $10,72 \pm 5,88$ mg/g ($p=0,0407$). Os resultados apontam para a eficácia do uso de etonogestrel em jaguatiricas, para reduzir a atividade ovariana, podendo ser usados em protocolos de inseminação artificial e demonstram a eficiência destes kits comerciais para análises de metabólitos fecais em pequenos felídeos selvagens.

Palavras-chave: reprodução, felídeos, monitoramento, inseminação.

ABSTRACT

Preventing further losses of biodiversity is a challenge for various research institutes, conservation breeding, zoos and aquariums, economic growth requires more the necessity of expanding agricultural and industrial production, this growth in turn ends up directly affect the biodiversity. Pollution, deforestation, hunting and illegal exploitation of protected areas affect directly the biological processes in the fragmenting landscapes and making continuous areas of forest mosaics formed by islands, preventing gene flow between these fragments. So a way out of this progressive loss of biodiversity is the reproduction in captivity. Seeks to understand the dynamics of ovarian processes in small felines, was conducted non-invasive hormone monitoring in five females of ocelot (*Leopardus pardalis*) (n=5) subjected to artificial insemination protocol. It was used etonogestrel (Implanon®, Organon Brazil's Industry and commerce, São Paulo - SP) manufactured for human use, to stop the process of ovarian activity of females of ocelot. For fecal hormone assays, were used commercial kits for estradiol (DRG® Estradiol ELISA - EIA-2693) and progesterone (DRG® progesterona ELISA - EIA-1561). There was a significant decrease in ovarian activity during the period of implantation, showing a significant difference between the means according to the nonparametric test of Mann-Whitney decreased estrogen levels from 1950.69 ± 709.88 ng/g to 692.33 ± 275.14 ng/g ($p=0.0051$) and increasing concentrations of progestagens 1.5 ± 5.57 mg/g to 10.72 ± 5.88 mg/g ($p=0.0407$). The results point to the efficacy of etonogestrel in ocelots, to reduce ovarian activity and may be used in artificial insemination protocols and demonstrate the efficiency of these commercial kits for analysis of fecal metabolites in small wild felids.

Key-words: reproduction, felids, monitoring, insemination.

1. REVISÃO DA LITERATURA

CONSERVAÇÃO E REPRODUÇÃO DE PEQUENOS FELINOS EM CATIVEIRO – UMA REVISÃO

1.1 CONSERVAÇÃO DAS ESPÉCIES

Atualmente são conhecidas 37 espécies de felídeos selvagens no mundo, sendo que destas, 43% (16 de 37 espécies selvagens) estão categorizadas de acordo com os critérios da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) como Criticamente Ameaçada (uma espécie), Ameaçada (seis espécies) ou Vulnerável (nove espécies) (Macdonald *et al.*, 2010; IUCN, 2011, Herrick *et al.*, 2010). Os felídeos selvagens apenas não ocorrem naturalmente no continente Antártico, Madagascar e Austrália.

A caça predatória de felídeos é basicamente voltada para abastecer o comércio ilegal de pele, que aliados à destruição de seus habitats colocam estas espécies em algum critério de ameaça (Sarti *et al.*, 2001, Paz *et al.*, 2010).

A formação de ilhas de mata dificulta o fluxo gênico, resultando na diminuição da variabilidade genética nas populações locais de animais. Contudo métodos alternativos de manejo têm sido estudados no sentido de minimizar a perda de variabilidade genética das populações (Paz *et al.*, 2010).

A manutenção da diversidade genética depende da reprodução de indivíduos não aparentados. Assim, as biotécnicas reprodutivas surgem como importantes aliadas na conservação de espécies ameaçadas. Há necessidade de se pesquisar e desenvolver métodos que aumentem a fertilidade dos clados (ou grupos) ameaçados, assim como técnicas que aumentem a eficiência reprodutiva por meio de métodos naturais ou artificiais (Paz *et al.*, 2010).

Isto é importante para redução da endogamia ao longo do tempo, particularmente em populações com oportunidades limitadas para a adição de novos genes através de novos indivíduos. Estabelecer uma população geneticamente saudável, *ex situ* pode ser muito difícil para o grupo dos felídeos devido à incompatibilidade comportamental e falta de conhecimento e informação sobre os

padrões comportamentais, manejo de criação e biologia básica das espécies, além da dificuldade de se alcançar um grande número de indivíduos reprodutivamente ativos (Wildt *et al.*, 2010, Santymire *et al.*, 2011; Nei Moreira, 2012, comunicação pessoal).

Todos os sete membros da linhagem da jaguatirica são encontrados na América Central e do Sul, alguns ocorrendo naturalmente a partir do sul da América do Norte (Arizona). Esta talvez seja a linhagem mais confusa, porque muitos dos membros têm a coloração da pele muito semelhante entre si. Todos são intimamente relacionados, sendo agrupados atualmente no gênero *Leopardus* (Sanderson e Watson, 2011, Macdonald, 2009).

Para Swanson e Brown (2004), a conservação dos pequenos felídeos sul-americanos é um grande desafio, diante do crescimento da população neste continente, com consequente aumento na exploração e destruição dos habitats desses animais.

No Brasil, ocorrem seis espécies de pequenos felídeos, sendo cinco do gênero *Leopardus*: gato-palheiro (*Leopardus colocolo*), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*) e jaguatirica (*Leopardus pardalis*) (Figura 1) (Paz *et al.*, 2010, Sunkist e Sunkist, 2002).

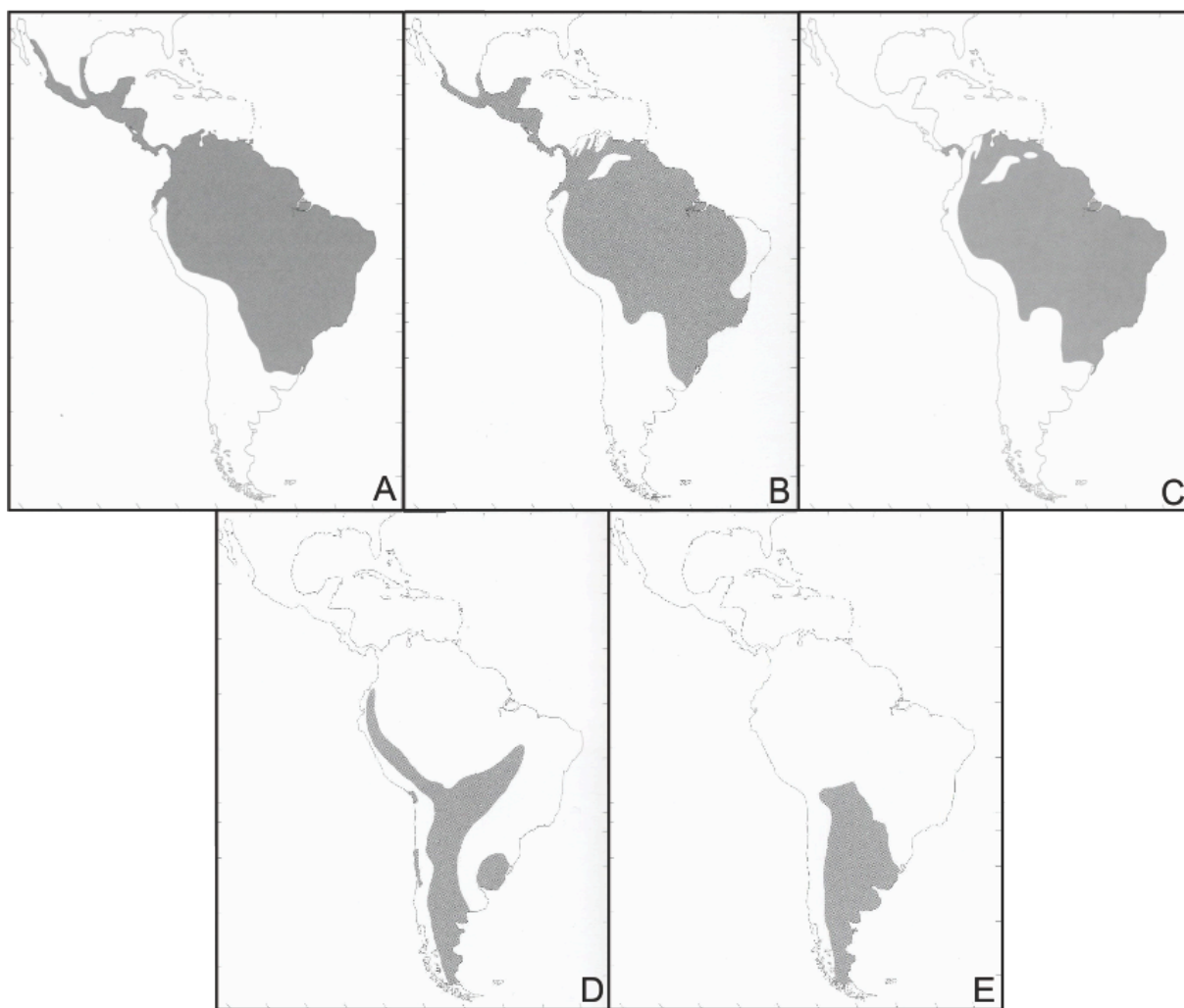


Figura 1. Mapa de distribuição do gênero *Leopardus* para a América, (A) jaguatirica (*L. pardalis*), (B) gato-maracajá (*L. wiedii*), (C) gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*), (D) gato-palheiro (*L. colocolo*), (E) gato-do-mato-grande (*L. geoffroyi*) – Adaptado de Sunquist e Sunquist, 2002.

As jaguatiricas ocorrem do Arizona, sul dos EUA, ao norte da Argentina (figura 1 A), habitando preferencialmente áreas de mata fechada. Alimentam-se basicamente de pequenos roedores, marsupiais, répteis, anfíbios, aves e, ocasionalmente, de peixes; oportunamente também capturam filhotes de catetos, veados, macacos e bichos-preguiça. Forrageiam no solo da mata, exploram o dossel da floresta, preferindo presas de até 8 kg. Podem atacar criações domésticas, principalmente aves. Possuem hábito solitário e, preferencialmente, noturno. Seus territórios podem variar de 4 a 90,5 Km² para os machos, sendo que território do macho pode englobar o de várias fêmeas, que varia de 1,3 a 75 km². Possuem uma gestação que varia 79 a 82 dias (Hunter, 2011, Sunquist e Sunquist, 2002, Kitchener, 1991).

Em 2001, a população de jaguatiricas mantidas em cativeiro no Brasil era composta por cerca de 350 indivíduos (Adania, 2002). Moreira (2001), verificando as taxas de natalidade e mortalidade desta espécie em cativeiro, concluiu que o principal crescimento desta população não se dá por indivíduos nascidos em cativeiro, mas sim pelo recebimento de animais oriundos da natureza, geralmente provenientes de apreensões realizadas pelos órgãos ambientais.

1.2 FISIOLOGIA REPRODUTIVA DE FELÍDEOS

O eixo hipotálamo-hipófise-gonadal consiste em um conjunto de tecidos com intercomunicação neural e endócrina, que funciona como uma unidade integrada na regulação da fertilidade. A organização básica deste eixo fisiológico é responsável pela reprodução em uma ampla riqueza de espécies de vertebrados, incluindo aves, répteis, peixes e mamíferos. As células gonadotrópicas estão localizadas na hipófise anterior e possuem um papel particularmente importante dentro deste sistema, como intermediárias entre o hormônio liberador de gonadotropinas do hipotálamo (GnRH) e os reservatórios de células germinativas e hormonais localizadas nas gônadas. A expressão do receptor de GnRH (GnRHR) é uma das características das células gonadotrópicas. A ligação do GnRH ao seu receptor desencadeia uma série complexa de sinais intracelulares, promovendo eventos de transdução dentro da célula gonadotrópica, esta cascata de sinalização desencadeia a resposta fisiológica geral das células ao estímulo do GnRH, culminando com a síntese e liberação das gonadotrofinas, os hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) (Bliss *et al.*, 2010).

Os hormônios gonadais (progestágenos e estrógenos) e os corticoides são compostos lipídicos conhecidos como esteroides porque derivam do colesterol. Sua síntese ocorre a partir da ligação da acetil-CoA ao colesterol, este processo ocorre no retículo endoplasmático liso. O colesterol é transportado para as mitocôndrias, posteriormente sua cadeia lateral é clivada e originando a pregnenolona. A pregnenolona é então convertida à progesterona no retículo endoplasmático. Para os hormônios gonadais, a hidroxilação e descarboxilação da progesterona levam à formação de andrógeno, este processo ocorre no citoplasma (Greco & Stabenfeldt, 1999).

Os hormônios são a essência da reprodução, assim, compreender os fatores que influenciam a função endócrina é fundamental para maximizar o sucesso reprodutivo das espécies (Brown, 2006). Entender o básico da endocrinologia reprodutiva dos felídeos é vital para a sua manutenção e conservação (Brown, 2011).

Desvendar as complexidades da reprodução, com suas variações espécie-específicas é um desafio para os conservacionistas que procuram melhorar a qualidade das populações de animais selvagens através da reprodução assistida (Durrant, 2009).

Estudos endócrinos em pequenos felídeos neotropicais são raros, mesmo que estes estejam ameaçados de extinção (Genaro *et al.*, 2007). O sucesso na aplicação de técnicas de reprodução em felídeos brasileiros em cativeiro é baixo (Morais *et al.*, 1997; Brown e Wildt, 1997; Swanson e Wildt, 1997).

No entanto, a informação básica obtida através de estudos endócrinos pode ser fundamental para o sucesso ou fracasso na reprodução das espécies ameaçadas (Goodrowe *et al.*, 2000).

Avanços de cunho importante têm ocorrido a respeito da reprodução em felídeos selvagens, utilizando-se como base estudos comparativos com gatos domésticos (*Felis catus*). Estudos envolvendo o gato-selvagem-europeu (*Felis silvestris*), o gato-do-deserto (*Felis margarita*) e o gato-de-patas-negras (*Felis nigripes*), levaram em consideração o gato doméstico como modelo prático (Rodini, 2008; Collier e O'Brien, 1985). Estudos mostram que mesmo com as semelhanças físicas com os gatos domésticos, os felídeos do gênero *Leopardus* pertencem a um grupo distante (Johnson *et al.*, 2006; Masuda *et al.*, 1996).

Considerando que o número reduzido de felídeos em cativeiro e na natureza limita a utilização dos mesmos para uma grande gama de experimentos, testes de novas técnicas reprodutivas são realizados em gatos domésticos, tornando-os peças fundamentais na conservação de felídeos selvagens (Martins, 2008).

Observa-se que para machos de felídeos da América Latina ocorre uma pequena variação sazonal nas características reprodutivas. Essa variação observada foi relacionada com a produção espermática, que foi maior durante o verão, porém não ocorreu uma variação significativa na qualidade espermática durante o ano todo (Morais *et al.*, 2002; Swanson e Brown, 2004). Moreira *et al.*, (2001) avaliaram, na região Sul do Brasil, três espécies de pequenos felídeos, *L.*

tigrinus, *L. wiedii* e *L. pardalis*, descrevendo ausência de sazonalidade marcante, caracterizando as fêmeas dessas espécies como poliétricas anuais. As fêmeas de gato-maracajá apresentaram episódios de ovulação espontânea, ou seja, independente de cópula.

É evidente que em felídeos ocorrem variações expressas e marcantes nos mecanismos reprodutivos entre as espécies. Identificar o tipo de ovulação (induzida ou espontânea) e avaliar o efeito da sazonalidade na reprodução de cada espécie é importante, pois essas duas características impactam diretamente na reprodução natural e assistida (Brown, 2011).

1.3 USO DE GONADOTROPINAS EXÓGENAS

A utilização de hormônios exógenos tem por objetivo estimular a função reprodutiva, induzindo o estro e a ovulação. A aplicação de estrógenos ou compostos relacionados pode influenciar no ciclo estral, podendo também estimular a função ovariana, incluindo uma possível ovulação. A ovulação em todas as espécies de mamíferos engloba duas fases distintas: o desenvolvimento e maturação de folículos ovarianos e consequente ovulação seguida da formação do corpo lúteo. A formação e o desenvolvimento de folículos ovarianos são ocasionados por estímulos da secreção de FSH através da glândula pituitária. A glândula pituitária também regula o processo ovulatório pela secreção de LH durante a fase final do período pré-ovulatório do ciclo estral (Wildt *et al.*, 1980).

A utilidade primária da indução da ovulação para a inseminação artificial é a sincronização do estro para maximizar o uso de sêmen fresco ou descongelado. A manipulação do ciclo estral tem sido extensivamente estudada e aplicada com sucesso para sistemas de manejo reprodutivo. Dentre as espécies ameaçadas, a maioria dos estudos é direcionada para felídeos, mesmo que os resultados da estimulação com o uso de gonadotropinas vêm se mostrando altamente variáveis entre as espécies com taxas de prenhez ainda baixas (Durrant, 2009).

O sucesso de programas de reprodução assistida está em no controle do ciclo ovariano. A ovulação pode ser induzida através de vários métodos em gatas, controlando assim a sua fertilidade (Colby, 1970).

A resposta ovariana às gonadotropinas exógenas varia tanto entre espécies, como também entre indivíduos de uma mesma espécie. Desta forma, para diferentes

espécies de felídeos, criaram-se diferentes protocolos hormonais, entre essas espécies estão: o leopardo-nebuloso (*Neofelis nebulosa*), o guepardo (*Acinonyx jubatus*) e a jaguatirica (*Leopardus pardalis*). O tempo intervalar entre as aplicações das gonadotropinas também interferem na resposta ovariana. Moléculas exógenas como o eCG, aplicadas a intervalos curtos acabam por sensibilizar o sistema imunológico, criando uma resposta imunológica ao eCG, interferindo na resposta ovariana e na eficácia da inseminação artificial (Howard *et al.*, 1997; Swanson e Brown, 2004; Pelican *et al.*, 2006; Pope *et al.*, 2006; Wildt *et al.*, 2010).

A estimulação com gonadotropinas em felídeos normalmente está associada com o desenvolvimento de corpos lúteos e folículos acessórios, resultando em ondas prolongadas e elevadas nas concentrações de estradiol e um aumento na produção de progesterona. O corpo lúteo libera de forma contínua a progesterona, alterando assim a resposta fisiológica do organismo à administração de análogos do FSH e LH. (Roth *et al.*, 1997).

Pelican *et al.*, (2008), demonstra que a presença de corpo lúteo pode interferir e comprometer a resposta ovariana mediante a aplicação de gonadotropinas exógenas, uma vez que a fêmea apresentando corpo lúteo, este consequentemente produz progestágenos, o que reduz significativamente a resposta ovariana às gonadotropinas exógenas. Isso ocorre, pois a progesterona presente no sangue reduz a atividade ovariana causando um *feedback* negativo no eixo hipotalâmico-hipofisário (Pelican *et al.*, 2006).

A estimulação repetida com eCG e hCG acarreta em uma resposta imunológica, com produção de imunoglobulinas reagentes às gonadotropinas exógenas, reduzindo consideravelmente a atividade biológica dessas proteínas. Os anticorpos IgG produzidos pela administração do eCG afetam negativamente a fertilidade e está relacionado ao retardamento do estro e a uma onda de LH mais tardia. As gatas domésticas quando estimuladas repetidamente com eCG/hCG, em um intervalo curto entre 45 e 50 dias, apresentam redução significativa no desenvolvimento folicular e na maturidade dos oócitos a partir do terceiro tratamento, sendo recomendados pelo menos 4 meses entre os tratamentos com as gonadotrofinas exógenas para reduzir a resposta imune (Swanson *et al.*, 1995; Roy *et al.*, 1999; Swanson *et al.*, 1996)..

O ciclo estral natural parece não ser afetado pela presença das imunoglobulinas Neutralizantes de eCG/hCG, observado que de um a dois meses

depois do quarto tratamento, sinais comportamentais de estro foram detectados e múltiplos folículos observados pela laparoscopia (Swanson *et al.*, 1995). Desta forma, embora regimes alternativos com gonadotrofinas possam minimizar os efeitos colaterais, é preferível evitar as complicações imunológicas através do uso cauteloso do eCG e hCG nos felinos (Villaverde e Lopes, 2007).

A prioridade é o desenvolvimento de protocolos para indução da ovulação, que resultem em respostas mais homogêneas, sem hiperestimulação ovariana, para fornecer um ambiente ideal para a fertilização e o desenvolvimento embrionário (Brown, 2011).

Diversos estudos com várias espécies demonstram que perfis endócrinos anormais resultam em uma produção folicular anormal, diminuindo a qualidade dos oócitos, baixa implantação embrionária e o insucesso nos resultados de prenhez. A diminuição da fertilidade em algumas espécies está relacionada com a hiperestimulação ovariana, levando a altas concentrações de estradiol, produção prematura, excessiva de progesterona e luteólise prematura (Tavaniotou *et al.*, 2001; Fossum *et al.*, 1989).

Donoghue *et al.* (1992) demonstraram que em algumas pesquisas, as resposta do gato doméstico às gonadotropinas exógenas foi melhorada quando as fêmeas são submetidas a um protocolo de inativação ovariana, prévia ao estímulo com gonadotropinas exógenas.

A inativação ovariana é utilizada para a obtenção de resposta mais homogênea e o resultado é uma população de folículos antrais recentes altamente suscetíveis à estimulação por gonadotropinas (Zelevnik, 2001).

Pelican *et al.* (2008) demonstraram que o progestágeno levonorgestrel foi eficaz ao suprimir a atividade ovariana em gatas domésticas, muito semelhante aos resultados de Pelican *et al.* (2005). Assim os progestágenos apresentam uma maneira reversível e segura para os protocolos de inativação ovariana. Ballarotti *et al.* (2009) também demonstrou que, em gatas domésticas progestinas como o etonogestrel (Implanon®, Organon International, Holanda) obtiveram efeito positivo na redução da atividade ovariana. Silva (2009) mostra que o uso de altrenogest (Regumate®, Intervet, São Paulo) em gato-do-mato-pequeno, também é eficaz na redução de atividade ovariana.

Assim estes estudos podem ser úteis no desenvolvimento e aplicação de novos protocolos de IA em felídeos silvestres, uma vez que diminui a possibilidade

de ocorrência de hiperestrogenismo após a estimulação com gonadotropinas exógenas (Pelican *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 1995; Ballarotti, 2005; Brown, 2006; Pelican *et al.*, 2005; Pelican *et al.*, 2006; Swanson, 2006).

1.4 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM FELÍDEOS

Uma das principais aplicações da inseminação artificial na conservação de espécies ameaçadas é evitar a depressão genética causada pela fragmentação dos grupos. Portanto, para algumas espécies que vivem em pequenas populações, pode ser viável a captura de fêmeas para curtos períodos de Inseminação Artificial realizados com espermatozoides coletados de zoológicos os quais mantêm machos saudáveis. Após o procedimento as fêmeas poderiam ser devolvidas ao seu habitat natural para gerar uma nova prole com uma nova variabilidade gênica. A opção contrária auxiliaria na manutenção da variabilidade genômica na comunidade cativa de animais selvagens. Além disso, a Inseminação Artificial pode ser aplicada em cativeiro para espécies não domésticas, evitando expor o animal ao estresse imposto por exemplo, na translocação, dos animais envolvidos na reprodução (Pukazhenthi e Wildt, 2004, Andrabi e Maxwell, 2007).

Aplicação de biotecnologias reprodutivas para se evitar a extinção de animais selvagens é mais raro do que as aplicadas para evitar ameaças às raças domésticas. Um limitante para as pesquisas com espécies selvagens é a questão de recursos limitados que acabam deixando o ritmo mais lento. Outro fator limitante envolve a complexidade da gestão e conservação de espécies ameaçadas. Na prática, as atuais tecnologias reprodutivas são espécie-específica ou ineficiente para muitos animais ameaçados de extinção, requerendo muitas adaptações, uma vez que o conhecimento é insuficiente a cerca da reprodução básica, como ciclo estral, a sazonalidade, a anatomia estrutural, fisiologia dos gametas ou mesmo o local para deposição do sêmen e transferência de embriões em espécies silvestres (Andrabi e Maxwell, 2007).

A produção de uma prole geneticamente valiosa através da aplicação de técnicas invasivas, tais como a Inseminação Artificial, irá aumentar a sobrevivência a longo prazo das espécies em cativeiro ou em estado selvagem. (Durrant, 2009).

A inseminação artificial (IA) é uma técnica que vem sendo aperfeiçoada em diversas espécies de felídeos, haja vista a ocorrência de nascimentos de filhotes em nove espécies de felídeos, entre estas podemos citar a jaguatirica e o gato-do-mato-pequeno, sendo relatados como os primeiros registros de gestação em pequenos felídeos sul americanos por meio de inseminação artificial no Brasil (Moraes *et al.*, 1997). Várias vantagens pode ser observadas na utilização da IA, entre elas o fato de ser um procedimento relativamente simples e eficaz, uma vez que o sêmen utilizado seja de boa qualidade e que os protocolos de indução folicular e ovulação tenham sido bem executados (Moraes *et al.*, 1997; Swanson e Brown, 2004; Swanson, 2006).

A IA possibilita a utilização de sêmen resfriado ou criopreservado, dispensando a movimentação de animais entre instituições. Facilita o manejo genético em cativeiro, uma vez que o intercâmbio de animais entre instituições encontra-se cada vez mais difícil, por razões sanitárias e leis ambientais mais severas (Wildt e Roth, 1997; Swanson e Brown, 2004; Swanson, 2006; Andrabi e Maxwell, 2007).

As taxas no sucesso de obtenção de crias através da inseminação artificial em gatas domésticas ainda é baixa, mesmo que seja viável tanto com sêmen fresco quanto congelado. Muitos autores também discutem esta dificuldade na reprodução assistida em pequenos felídeos silvestres (Tsutsui, 2006; Swanson e Brown, 2004; Pelican *et al.*, 2006). Lacerda-Neto *et al.*, (2004) observaram que em gatas domésticas submetidas a cirurgias para IA, as concentrações de cortisol aumentaram após os procedimentos cirúrgicos, retornando aos níveis basais aproximadamente 72 horas depois, indicando que os procedimentos cirúrgicos podem ser fatores causadores de estresse prolongado.

Uma forma de amenizar o aumento de cortisol pós-cirúrgico, é a criação de novos métodos para IA para deposição de sêmen intrauterino em felinos de cativeiro, assim aumentando as taxas reprodutivas (Tsutsui, 2006). Porém, mesmo eliminando o efeito da elevação do cortisol pela cirurgia, é possível que ainda ocorra uma elevação do cortisol devido à contenção física e química dos animais estudados (Micheletti *et al.*, 2011).

1.5 MONITORAMENTO HORMONAL NÃO INVASIVO

Métodos práticos para monitoramento da atividade endócrina são essenciais para avaliar o potencial reprodutivo dos animais. Auxiliam no desenvolvimento de novas tecnologias as quais podem auxiliar na reprodução quando a monta natural falhar (Brown, 2006).

A análise hormonal fecal tornou-se recentemente um método comum para estudos não invasivos sobre a fisiologia de animais de vida livre e de cativeiro. As fezes da maioria das espécies de vertebrados contêm metabólitos de praticamente todos os principais hormônios esteróides (progestágenos, estrógenos, andrógenos, glicocorticoides e mineralocorticoides), pois estes são metaboizados no fígado e secretados para o intestino pela bile, via suco biliar (Hunt *et al.*, 2004, Khan *et al.*, 2002).

Em ambientes de cativeiro, as amostras fecais podem ser coletadas e congeladas em seguida evitando o deterioramento das estruturas químicas ali presentes. As amostras de fezes assim como a maioria das amostras biológicas, estáveis ao longo do tempo quando armazenadas a temperaturas abaixo de zero (Khan *et al.*, 2002).

O monitoramento e avaliação da resposta fisiológica ao estresse e ciclo reprodutivo é uma ferramenta básica para compreender e melhorar a saúde animal e bem-estar (Chelini *et al.*, 2006).

O monitoramento não invasivo de hormônios fecais ou provenientes da urina é eficaz para a realização do acompanhamento longitudinal dos eventos reprodutivos em animais selvagens, além do que elimina estressores potenciais associados à retirada de sangue. A utilização destas técnicas para monitoramento não invasivo em tempo real pode melhorar tanto a reprodução assistida quanto a monta natural (Goodrowe *et al.*, 2000; Brown, 2011).

Segundo Rodini (2008), o monitoramento não invasivo traz grandes vantagens, pois elimina a necessidade de se utilizar a contenção química e física para a coleta de material biológico (sangue) a fim de se realizar o acompanhamento hormonal.

2. REFERÊNCIAS

- ADANIA, C. H. **Elaboração e análise de registro genealógico studbook de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) em cativeiro no Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 157p. 2002.
- ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.223–243, 2007.
- BALLAROTTI, D. T. **Avaliação de protocolos para indução de inatividade ovariana em gatas domésticas**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.
- BALLAROTTI, D. T.; MORAES, W.; OLIVEIRA, C. A.; FELIPPE, É. C.; MOREIRA, N. **Avaliação de protocolos para indução de inatividade ovariana em gatas domésticas**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 46, n.6, p.465-473, 2009.
- BLISS, S. P.; NAVRATIL, A. M.; XIE, J.; ROBERSON, M. S. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.31 p.322–340, 2010.
- BROWN, J. L. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. **Theriogenology**, v.66 p.25-36, 2006.
- BROWN, J. L. Female reproductive cycles of wild female felids. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.155–162, 2011.
- BROWN, J. L.; WILDT, D. E. Assessing reproductive status in wild felids by non-invasive faecal steroid monitoring. **International Zoo Yearbook**, v.35, p.173–191, 1997.
- BROWN, J.L.; WILDT, D. E.; GRAHAM, L.H.; BYERS, A.P.; COLLINS, L.; BARRETT, S.; HOWARD, J.G. Natural versus chorionic gonadotropin-induced ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed by fecal steroid analysis. **Biology of Reproduction**, v.53, p.93-102, 1995.
- CHELINI, M. M.; SOUZA, N. L.; CORTOPASSI, S. R. G.; FELIPPE, É. C. G.; OLIVEIRA, C. A. Assessment of the physiologic stress response by quantification of fecal corticosteroids. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v.45, n.3, p.8–11, 2006.
- COLLIER, G.E.; O'BRIEN, S.J. A molecular phylogeny of the Felidae: immunological distance. **Evolution**, v.39, n.3, p.473-487, 1985
- COLBY, E.D. Induced estrus and timed pregnancies in cats. **Laboratory Animals Care**, v. 20 n. 6, p. 1075-1080, 1970.

- DONOGHUE, A. M.; JONSTHON, L. A.; LUNSON, L.; BROWN, J. L.; WILDT, D. E. Influence of gonadotropin treatment interval on follicular maturation, in vitro fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 972-980, 1992.
- DURRANT, B.S. The importance and potential of artificial insemination in CANDES (companion animals, non-domestic, endangered species). **Theriogenology**, v.71, p.113–122, 2009.
- FOSSUM, G. T.; DAVIDSON, A.; PAULSON, R. J. Ovarian hyperstimulation inhibits embryo implantation in the mouse. **Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer: IVF**, v. 6, p. 7–10, 1989.
- GENARO, G.; MORAES, W.; SILVA, J.C.R.; ADANIA, C.H.; FRANCI, C.R. Plasma hormones in Neotropical and domestic cats undergoing routine manipulations. **Research in Veterinary Science**, v.82 p.263–270, 2007.
- GOODROWE, K. L.; WALKER, S. L.; RYCKMAN, D. P.; MASTROMONACO, G. F.; HAY, M. A.; BATEMAN, H. L.; WADDELL, W. T. Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.60–61, p.389–403, 2000.
- HERRICK, J. R.; BOND, J. B.; CAMPBELL, M.; LEVENS, G.; MOORE, T; BENSON, K.; D'AGOSTINO, J.; WEST, G.; OKESON, D. M; COKE, R.; PORTACIO, S. C.; LEISKE, K.; KREIDER, C.; POLUMBO, P. J.; SWANSON, W. F. Fecal endocrine profiles and ejaculate traits in black-footed cats (*Felis nigripes*) and sand cats (*Felis margarita*). **General and Comparative Endocrinology**, n.165, p.204–214, 2010.
- HOWARD, J. G.; ROTH, T. L.; BYERS, A. P.; SWANSON, W. F.; WILDT, D. E. Sensitivity to exogenous gonadotropins for ovulation induction and laparoscopic artificial insemination in the cheetah and clouded leopard. **Biology of Reproduction**, v.56, p.1059-1068, 1997.
- HUNT, K. E.; TRITE, A. W.; WASSER, S. K. Validation of a fecal glucocorticoid assay for Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). **Physiology & Behavior**, n.80 p. 595– 601, 2004.
- HUNTER, L. **Princeton field guides: Carnivores of the world**. New Holland Publishers (UK) Ltd. London. 240p. 2011.
- IUCN 2011. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2011.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org> Acessado em: 25 fev. 2012.
- JOHNSON, W. E.; EIZIRIK, E.; PECON-SLATTERY, J.; MURPHY, W. J.; ANTUNES, A.; TEELING, E.; O'BRIEN, S. J. The Late Miocene Radiation of Modern Felidae: A Genetic Assessment. *Science*, v.311, p.73-77, 2006.

- KHAN, M. Z.; ALTMANN, J.; ISANI, S. S.; YU, J. A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis. **General and Comparative Endocrinology**, n.128, p.57–64, 2002.
- KITCHENER, A. **The natural history of the wildcats**. Cornell University Press, Ithaca, New York. 278p. 1991.
- LACERDA-NETO, J. C.; BARBOSA, J. C.; LUNARDI, L. O.; SILVA, A. A. M. R.; GENARO, G. Effects of surgical stress on the secretion of luteinizing hormone, testosterone and cortisol in the domestic cat (*Felis catus*). **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.4, p.211-214, 2004.
- MACDONALD, D. W.; The **Princeton Encyclopedia of mammals**. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 936p. 2009.
- MACDONALD, D. W.; LOVERIDGE, A. J.; NOWELL, K. Dramatis personae: an introduction to the wild felids. In: MACDONALD, D.; LOVERIDGE, A.J. (Eds.) **Biology and Conservation of Wild Felids**, Oxford University Press, Oxford. p.3-58, 2010.
- MARTINS, L. R. Influência da sazonalidade e da condição ovariana sobre a produção embrionária *in vitro* de gato doméstico (*Felis catus*, Linnaeus 1758). Universidade Estadual Paulista. Botucatu. São Paulo. 2008.
- MASUDA R.; LOPEZ, J. V.; PECON-SLATTERY, J.; YUHKI, N.; O'BRIEN, S. J. Molecular phylogeny of mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA sequences in the Felidae: Ocelot and Domestic cat lineages. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.6, n.3, p.351–365, 1996.
- MICHELETTI, T.; CUBAS, Z. S.; MORAES, W.; OLIVEIRA, M. J.; KOZICKI, L. E.; WEISS, R. R.; MOREIRA, N. Reprodução assistida em felídeos selvagens – uma revisão Rev. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.4, p.408-417, 2011.
- MORAIS, R. N.; MUCCILOLO, R. G.; GOMES, M. L. F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; GRAHAM, L. H.; SWANSON, W. F.; BROWN, J. L. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v.57, p.2027-2041, 2002.
- MORAES, W.; MORAIS, R. N.; MOREIRA, N.; LACERDA, O.; GOMES, M. L. F.; MUCCILOLO, R. G.; SWANSON, W. F. Successful artificial insemination after exogenous gonadotropin treatment in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrina*). In: **Proceedings American Association of Zoo Veterinarians**. Houston, Texas, p. 334-336, 1997.
- MOREIRA, N. **Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus***. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2001.

- MOREIRA, N.; BROWN, J. L.; MORAES, W.; SWANSON, W. F.; and MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Effect of housing and environmental enrichment on adrenocortical activity, behavior and reproductive cyclicity in the female tigrina (*Leopardus tigrinus*) and margay (*Leopardus wiedii*). **Zoo Biology**, n.26, p.441-460, 2007.
- MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; MORAES, W.; SWANSON, W. F.; GRAHAM, L. H.; PASQUALI, O. L.; GOMES, M. L. F.; MORAIS, R. N.; WILDT, D. E.; and BROWN, J. L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biology**, n.20, p.103-116, 2001.
- PAZ, R. C. R.; ADANIA, C. H.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C. Detecção de estro em jaguatirica (*Leopardus pardalis*) utilizando citologia vaginal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.62, n.6, p.1409-1414, 2010.
- PELICAN, K. M.; BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; OTTINGER, M. A.; HOWARD, J.G. Short term suppression of follicular recruitment and spontaneous ovulation in the cat using levonorgestrel versus a GnRH antagonist. **General and Comparative Endocrinology**, v.144, p. 110–121, 2005.
- PELICAN, K. M.; WILDT, D. E.; OTTINGER, M. A.; HOWARD, J.G. Priming with progestin, but not GnRH antagonist, induces a consistent endocrine response to exogenous gonadotropins in induced and spontaneously ovulating cats. **Domestic Animals Endocrinology**, v.34, p.160–175, 2008.
- PELICAN, K. M.; WILDT, D. E.; PUKAZHENTHI, B.; HOWARD, J. G. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. **Theriogenology**, v.66, n.1, p.37-48, 2006.
- POPE, C. E.; GÓMEZ, M. C.; DRESSER, B. L. In vitro production and transfer of cat embryos in the 21st century, **Theriogenology**, v.66, p.59-71, 2006.
- PUKAZHENTHI, B. S.; WILDT, D. E. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.33–46, 2004.
- ROTH, T. L; WOLFE, B. A.; LONG, J. A.; HOWARD, J. G.; WILDT, D. E. Effects of equine chorionic gonadotropin, human chorionic gonadotropin, and laparoscopic artificial insemination on embryo, endocrine, and luteal characteristics in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v. 57, p, 165-171, 1997.
- RODINI, D. C. **Perfil analítico das progestinas fecais nas fases de puberdade e ciclicidade ovariana em onça-pintada (*Panthera onca*); Gestação e lactação em gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*)**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.
- ROY, F.; MAUREL, M. C.; COMBES, B.; VAIMAN, D.; CRIBIU, E. P.; LANTIER, I.; POBEL, T.; DELÉTANG, F.; COMBARNOUS, Y.; GUILLOU, F. The negative effect of repeated equine chorionic gonadotropin treatment on subsequent fertility in alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. **Biology of Reproduction**, v.60, p.805-813, 1999.

- SANDERSON, J. G.; WATSON, P. **Small wild cats: The animal answer guide**. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. 144p. 2011.
- SANTYMIRE, R. M.; BROWN, J. L.; STEWART, R. A.; SANTYMIRE, R. C.; WILDT, D. E.; HOWARD, J.G. Reproductive gonadal steroidogenic activity in the fishing cat (*Prionailurus viverrinus*) assessed by fecal steroid analyses. **Animal Reproduction Science**, v.128, p.60– 72, 2011.
- SARTI, P.; PAULA, T. A. R.; POLLI, G. O.; DECO SOUZA, T.; ARAUJO, G.R. Morfofisiologia do tecido intertubular e das células de Leydig de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) adulta. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.63, n.5, p.1060-1065, 2011.
- TAVANIOTOU, A.; SMITZ, J.; BOURGAIN, C.; DEVROEY, P. Ovulation induction disrupts luteal phase function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 943, p. 55-63, 2001.
- SILVA, T. M. R. **O uso de altrenogest para protocolos de reprodução assistida em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.
- SUNQUIST M.; SUNQUIST F. **Wild cats of the world**. The University of Chicago Press, Chicago. 452p. 2002.
- SWANSON, W. F.; BROWN, J. L. International training programs in Reproductive sciences for conservation of Latin American felids. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.21-34, 2004.
- SWANSON, W. F.; HOROHOV, D. W.; GODKE, R. A. Production of exogenous gonadotrophin neutralizing immunoglobulins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.105, p.35-41, 1995.
- SWANSON, W. F.; ROTH, T. L.; GRAHAM, K.; HOROHOV, D. W.; GODKE, R. A. Kinetics of humoral immune response to multiple treatments with exogenous gonadotropins and relation to ovarian responsiveness in domestic cats. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, p.302-307, 1996.
- SWANSON, W. F.; WILDT, D. E. Strategies and progress in reproductive research involving small cat species. **International Zoo Yearbook**, v.35, p.152–159, 1997.
- SWANSON, W.F. Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. **Theriogenology**, v.66, p.49-58, 2006.
- TSUTSUI, T. Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*). **Theriogenology**, v.66, p.122-125, 2006.

- VILLAYERDE, A. I. S. B.; LOPES, M. D. Inseminação artificial em gatos domésticos utilizando sêmen criopreservado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p.77-83, 2007.
- WILDT, D. E.; ROTH, T. L. Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids. **International Zoo Yearbook**, v.35, p.164-172, 1997.
- WILDT, D. E., SEAGER, S.W., CHAKRABORTY, P.K. Effect of copulatory stimuli on incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the cat. **Endocrinology**. v.107, n.4, p.1212-1217, 1980.
- WILDT, D. E.; SWANSON, W. F.; BROWN, J.; SLIWA, A.; VARGAS, A. Felids ex situ: managed programs, research and species recovery. In: MACDONALD, D.; LOVERIDGE, A.J. (Eds.), **The Biology and Conservation of Wild Felids**. Oxford University Press, Oxford, p. 217–236. 2010.
- ZELEZNIK, A. J. Follicle selection in primates: “Many are called but few are chosen”. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 655- 659, 2001.

3. CONCENTRAÇÕES FECAIS DE ESTRÓGENOS E PROGESTÁGENOS EM JAGUATIRICAS (*Leopardus pardalis*) SUBMETIDAS A PROTOCOLO HORMONAL PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

RESUMO. Compreender as características reprodutivas de felídeos silvestres é de extrema importância para programas de reprodução *ex situ*. Entender as interações e variações nos padrões hormonais mediante a supressão da atividade ovariana e o uso de gonadotropinas exógenas, além do domínio da técnica de inseminação artificial, pode ser decisivo para o sucesso na reprodução de pequenos felídeos em cativeiro. Algumas pesquisas mostraram a utilização com sucesso de implantes de progestinas para a supressão da atividade ovariana em gatas domésticas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação de uma progestina, o etonogestrel (Implanon[®], Organon do Brasil Indústria e Comércio, São Paulo – SP), sobre a atividade ovariana de fêmeas (n=5) de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*), em cativeiro no Refúgio Biológico Bela Vista da Itaipu Binacional (Foz do Iguaçu - PR). O estudo foi comparativo entre as fases sem e com implante anterior à aplicação de eCG e hCG. As fêmeas foram então submetidas a videolaparoscopia e inseminação artificial. Foram dosados, por meio de ensaio imunoenzimático, os metabólitos fecais de estrógenos e progestágenos em um período de 90 dias. Como resultados, de modo geral, observou-se a presença de múltiplos folículos secundários visualizados por videolaparoscopia. Verificou-se uma significativa diminuição na atividade ovariana durante o período de implante, mostrando uma diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste não paramétrico de Mann-Whitney, estrógenos diminuíram suas concentrações de $1950,69 \pm 709,88$ ng/g para $692,33 \pm 275,14$ ng/g ($p = 0,0051$) e as concentrações de progesterona aumentam de $5,57 \pm 1,5$ mg / g para $10,72 \pm 5,88$ mg / g ($p = 0,0407$). Esse trabalho aponta a eficácia do uso de etonogestrel em fêmeas de jaguatiricas (*L. pardalis*) para reduzir a atividade ovariana e evitar quadros de hiperestrogenismo após a administração de eCG e hCG.

Palavras-chave: Implanon, etonogestrel, estrógeno, progesterona, felinos.

ABSTRACT. Fecal concentrations of estrogens and progestagens in ocelots (*Leopardus pardalis*) submitted to hormonal protocol for artificial insemination.

Understanding the reproductive characteristics of wild felines is extremely important for ex situ breeding programs. Understanding the interactions and changes in hormonal patterns by suppressing ovarian activity and the use of exogenous gonadotropins, combined with the domain of the technique of artificial insemination can be decisive for the reproductive success of small felids in captivity. Some recent researches showed the successful use of progestin implants for the suppression of ovarian activity in domestic cats. This study aimed to evaluate the action of a progestin, etonogestrel (Implanon[®], *Organon Industry and Trade of Brazil*, São Paulo - SP) on ovarian activity in ocelots (*Leopardus pardalis*) females. Five females (n=5) were used at Refúgio Biológico Bela Vista da Itaipu Binacional (Foz do Iguaçu - Pr) and the study was comparison between the phases normal and implant before to administration of eCG and hCG. The females were subjected to the laparoscopic technique and artificial insemination. Fecal metabolites of estrogens and progestagens were measured over a period of 90 days, processed and evaluated by enzyme immunoassay techniques. As a result, in general, we observed the presence of multiple secondary follicles visualized by laparoscopy. There was a significant decrease in ovarian activity during the period of implantation, showing a significant difference between the means according to the nonparametric test of Mann-Whitney decreased estrogen levels in the 1950.69 ± 709.88 ng/g to 692.33 ± 275.14 ng/g ($p=0.0051$) and increasing concentrations of progesterone 1.5 ± 5.57 mg/g to 10.72 ± 5.88 mg/g ($p=0,0407$). This work shows the effectiveness of the use of etonogestrel in female ocelot (*L. pardalis*) to reduce ovarian activity and avoid frames hyperestrogenic after administration of eCG and hCG.

Key-words: Implanon, etonogestrel, estrogen, progesterone, felids.

4. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país que possui uma diversidade biológica que abriga aproximadamente dois milhões de espécies, representando 15 a 20% de toda a biodiversidade mundial (Lewinson & Prado 2004).

A Mata Atlântica é um dos biomas mais ricos em biodiversidade, mas também é um dos mais ameaçados, contendo apenas 8% de sua área total. Isso se deve ao alto potencial de exploração das áreas de ocorrência dessa formação florestal, tornando-a assim fragmentada. Os fragmentos florestais são pedaços de vegetações naturais que foram isoladas por ação antrópica ou por causas naturais diminuindo, significativamente, a passagem de animais e a dispersão de pólen ou sementes (Oliveira-Alves, 2005; Mazzolli & Hammer, 2008).

Em várias regiões tropicais, o processo de fragmentação florestal é uma realidade atual que vem aumentando, relacionada com as altas taxas de desmatamento. Este desmatamento vem ocorrendo em uma escala de tempo mais acelerada se comparada à escala histórica e geológica das florestas, alterando profundamente esses ecossistemas (Nascimento *et al.*, 1999).

Com as florestas cada vez mais fragmentadas e as populações de espécies florestais acabam sendo reduzidas, afetando a dispersão e migração, padrões ecológicos são interrompidos e os ecossistemas são isolados, os quais podem resultar em uma progressiva erosão da diversidade biológica (Tabarelli *et al.*, 1999).

Como resultado desta perda de habitat e erosão da diversidade biológica, temos um cenário em que muitas espécies acabam entrando em declínio, correndo sérios riscos de extinção, gerando desafios ao campo da biologia da conservação e resultado em perdas irreparáveis da variabilidade genética das espécies. (Wildt *et al.*, 1992).

Jardins zoológicos e outras instituições, como criadouros e aquários que fazem trabalhos de reprodução *ex situ*, podem ajudar a prevenir a extinção de espécies silvestres, podendo atuar como um banco de reserva biológica e ainda despertando o interesse da população sobre a vida selvagem (Moreira, 2001).

Os felídeos exercem um papel importante na cadeia trófica, estão entre os principais predadores, contribuindo assim para a manutenção dos ecossistemas (Castro, 2009), porém, enfrentam crescentes ameaças a sua existência na natureza.

Para algumas espécies, as populações em cativeiro podem representar um banco de reserva genômica para um futuro aumento populacional ou reintrodução genética (Swanson *et al.*, 2007).

A jaguatirica (*Leopardus pardalis*) ocorre naturalmente do sul do Texas ao norte da Argentina e Uruguai (Emmons & Feer, 1997; Stonehouse & Orr, 1999). São animais solitários, exceto quando as fêmeas estão com os filhotes ou em época de acasalamento. O território dos machos é maior e cobre áreas de ocupação de várias fêmeas. Seus territórios podem variar de 1,5 a 90 km². São caçadores noturnos, caçam roedores, répteis, anfíbios, marsupiais e, ocasionalmente, aves, podendo ainda incluir peixes, primatas e pequenos cervídeos (Eisenberg & Redford, 1999).

Pesquisas relacionadas à fisiologia reprodutiva desta espécie foram realizadas no Brasil (Moraes *et al.*, 1997; Moreira *et al.*, 2001; Swanson e Brown, 2004) e avaliaram o impacto de agentes estressores e a importância do enriquecimento ambiental (Moreira *et al.*, 2007).

O monitoramento endócrino pela mensuração de metabólitos urinários e fecais de hormônios esteroides tem se mostrado uma alternativa viável na investigação da fisiologia reprodutiva e do estresse em uma grande variedade de animais domésticos e selvagens. Esta abordagem tem contribuído para uma maior integração da endocrinologia com estudos comportamentais e ecológicos, gerando informações mais detalhadas em diversas áreas, tais como bem-estar animal, comportamento social, reprodução, biologia da conservação, biomedicina, entre outras (Pereira, 2007).

Um dos benefícios mais úteis do monitoramento endócrino é a avaliação das causas de baixa fertilidade e, em resposta, o aprimoramento dos procedimentos de reprodução assistida, eventualmente permitindo que essas ferramentas se tornem mais efetivas na propagação das espécies (Brown, 2006).

As formas químicas dos esteróides metabolizados são similares entre as espécies de felídeos, embora exista uma variação considerável entre as concentrações excretadas (Brown, 2006).

Uma revisão da literatura aponta que os felídeos possuem algumas variações acentuadas nos mecanismos de reprodução, e que uma melhor compreensão de sua fisiologia reprodutiva, fundamentalmente poderia facilitar o melhoramento genético, manejo e atividades de conservação (Brown, 2006).

Na área reprodutiva, estrógenos e progestágenos são grupos de hormônios responsáveis pelo desenvolvimento de caracteres sexuais femininos, anatômicos e comportamentais, além da função reprodutiva (Abbot & Hearn, 1978; Fujita *et al.*, 2004). Os métodos não invasivos para coleta de fezes, e sua posterior análise dos níveis de estrógenos e progestágenos excretados têm sido largamente utilizados, obtendo sucesso em acessar com alta confiabilidade o ciclo reprodutivo em vários mamíferos, cativos e de vida livre (Campbell *et al.*, 2001, Blanco & Meyer, 2009, Strier & Ziegler, 1997).

Métodos práticos para o monitoramento das atividades do sistema endócrino são essenciais para avaliar o potencial reprodutivo individual dos animais e para o desenvolvimento e utilização de técnicas de reprodução assistida, para quando a monta natural falhar. Hormônios são a essência da reprodução, portanto, a compreensão dos fatores que influenciam a função endócrina é fundamental para maximizar o sucesso reprodutivo das espécies (Brown, 2006).

Os protocolos de extração de esteroides fecais tornam-se cada vez mais simplificados, encurtando etapas da extração, resultando na redução de mão de obra e diminuição das variações relacionadas a etapas adicionais de extração (Palme *et al.*, 2005).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO E ANIMAIS

O estudo foi realizado no município de Foz do Iguaçu, a uma altitude de 173 m; com coordenadas geográficas: -25°54'45" S e -54°58'07" W, localizado no oeste do Estado do Paraná (IBGE, 2011), com animais alojados no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB), localizado no Refúgio Biológico Bela Vista.

Fêmeas de jaguatirica (*L. pardalis*, n=5), em idade reprodutiva (2 a 11 anos, Tabela 1) foram mantidas em recintos de 6,92 metros de comprimento por 2,87 metros de largura e 2,55 metros de altura.

Tabela 1 - Informações gerais sobre as fêmeas de jaguatirica utilizadas no experimento

Fêmea	Recinto	Entrada	Idade	Origem	Pai	Mãe
Lp 1897*	R-37	07.09.2000	11	CASIB	740	1159
Lp 2029	R-50	08.08.2002	9	CASIB	1720	1159
Lp 2322*	R-58	25.08.2005	>6	MS	?	?
Lp 2417	R-40	17.02.2009	2	CASIB	1720	2322
Lp 2428	R-45	06.05.2009	2	CASIB	2324	1897

*Fêmeas que já reproduziram no CASIB

Todas as cinco fêmeas foram mantidas individualmente nos recintos, que contêm troncos e um local para esconderijo (Figura 2). Os animais foram mantidos sem a visitação e com dieta controlada, alternada entre ratos inteiros (criados na instituição), pescoço de frango e carne bovina (Figura 3) e água *ad libitum*.

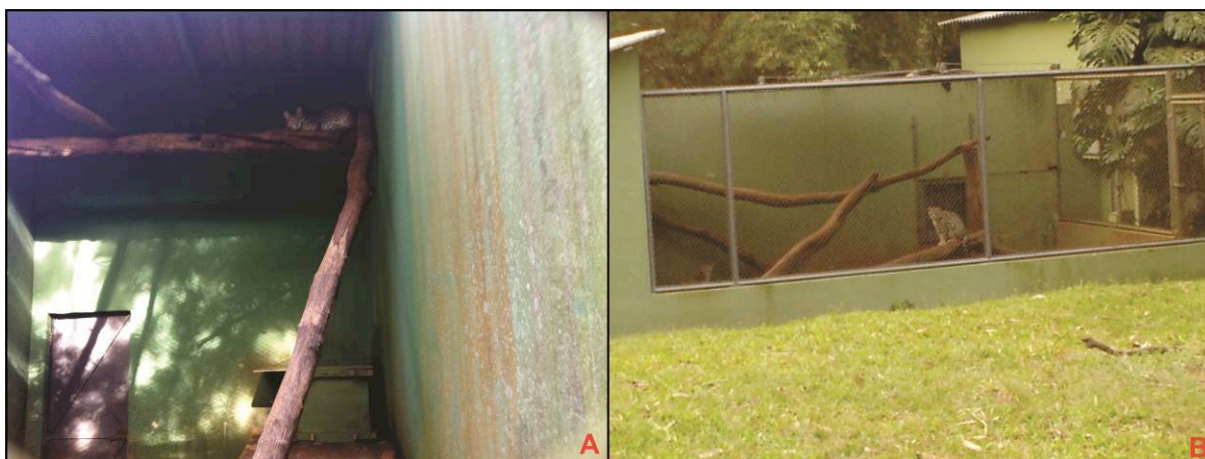


Figura 2. (A) Vista interna de um recinto; (B) Vista lateral de um recinto para jaguatiricas no CASIB.
Fonte: (A) O autor; (B) Renato H. Erdmann.



Figura 3. (A) Biotério localizado no CASIB; (B e C) Cozinha onde eram separados os alimentos que foram fornecidos aos animais.

5.2.1 CONTENÇÃO FÍSICA E PROTOCOLO ANESTÉSICO

Os animais foram capturados com auxílio de puçá, dentro de seus respectivos recintos (Figura 4 A), após ser realizada a contenção física, teve início o protocolo anestésico.

Para a contenção química, foi empregada a combinação via intramuscular de cetamina S(+) (3 mg/kg, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brasil), meperidina (4 mg/kg, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brasil) e midazolam (0,5 mg/kg, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brasil). Na sequência, via intravenosa, foi administrado propofol (3 mg/kg, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brasil) para indução anestésica. Para o protocolo de inseminação artificial, o qual exige mais tempo para ser realizado, os animais foram intubados e a anestesia foi mantida com isoflurano (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brasil) na concentração de 1,5%V.



Figura 4. (A) Jaguatirica contida fisicamente com auxílio de puçá; (B) Animal já sedado e sendo transportado para o Hospital Veterinário do Refúgio Biológico Bela Vista da Itaipu Binacional. Fonte: Renato H. Erdmann.

5.3.1 TRATAMENTO HORMONAL

Quatro fêmeas receberam um implante contendo 68 mg de etonogestrel com excipiente em copolímero de etileno vinil acetato (Implanon[®], Organon do Brasil Indústria e Comércio, São Paulo - SP), o qual foi mantido por 30 dias, com o objetivo de induzir a inatividade ovariana. Depois de concluída a contenção química, as fêmeas foram posicionadas em decúbito lateral, sendo após, realizada a depilação no local da aplicação seguida de uma antissepsia local. Então utilizando o aplicador contendo o implante foi inserido na região da intraescapular (Figura 5). Os implantes foram removidos 30 dias após a sua inserção. Para a remoção, os animais foram anestesiados, novamente foi realizada a depilação e antissepsia local, com auxílio de um bisturi foi realizada uma incisão de aproximadamente 1,5 cm, próxima à extremidade do implante, a partir deste ponto foi possível a remoção com auxílio de uma pinça. Terminado o processo de remoção, a incisão foi fechada com um ponto cirúrgico.



Figura 5. Com o animal sedado (A) é realizada a depilação do local do implante e realizada antissepsia local; (B e C) Com o aplicador, é feita a inserção do implante; (D) Término da aplicação do implante.

Depois de retirado o implante, foram administradas via intramuscular, 500 UI de eCG (gonadotropina coriônica equina, Novormon 5000[®], Intervet, São Paulo - SP), para estimular o desenvolvimento folicular ovariano. Oitenta horas após, cada fêmea recebeu uma injeção de 225 UI de hCG (gonadotropina coriônica humana, Chorulon 1000[®], Intervet, São Paulo - SP) para maturação folicular e indução da ovulação. Estas gonadotropinas foram aplicadas com diferença de 80-84 horas entre elas, para todas as fêmeas do experimento (Silva, 2009).

5.4.1 SÊMEN

O sêmen foi coletado e criopreservado. A coleta de sêmen das jaguatirica foi realizada por meio de eletroejaculação, em parceria com o pesquisador Renato H. Erdmann, compreendendo uma fase da sua tese para obtenção do título de Doutor.

Após a colheita, o sêmen passou por uma avaliação de motilidade, vigor e concentração. Esta avaliação é repetida após o descongelamento, quando então ocorre a inseminação artificial (IA). (Erdmann, 2005). Esse protocolo já produziu ninhadas de oito espécies de felídeos, inclusive de jaguatiricas (Silva, 2009).

5.5.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

O procedimento de inseminação artificial visa avaliar a viabilidade do método de criopreservação de sêmen e testar protocolos de indução de ovulação nas fêmeas, com inativação ovariana e subsequente estimulação com gonadotropina coriônica equina (eCG) e gonadotropina coriônica humana (hCG).

Quatro fêmeas de jaguatiricas foram induzidas para ovulação com protocolo derivado de Swanson (1996); Pelican (2005); Ballarotti (2009) e Toyonaga (2011), que publicaram artigos semelhantes com jaguatiricas e outras espécies de felídeos.

Trinta horas após o tratamento hormonal descrito anteriormente, as fêmeas foram submetidas à videolaparoscopia para avaliação da resposta ovariana e submetidas à inseminação artificial (IA) intrauterina com sêmen descongelado.

Para o procedimento de videolaparoscopia, os animais foram sedados, pesados, feita a coleta de sangue e realizada uma tricotomia na região da incisão cirúrgica, o animal então foi colocado em uma sala cirúrgica, previamente preparada, na posição de Trendelenburg (cabeça para baixo com o corpo em um ângulo de aproximadamente 40 graus), então foi realizada a antisepsia local, para início da cirurgia (Figura 6).

Durante todos os procedimentos envolvendo anestesia, os animais foram monitorados por um equipamento multiparamétrico (Figura 6 C).



Figura 6. Animal sedado (A) animal com a tricotomia realizada na região ventral; (B) Animal posicionado para o início do procedimento cirúrgico; (C) animal sendo monitorado por equipamento multiparamétrico após a inserção do implante.

O corno uterino selecionado para IA foi o ipsilateral ao ovário que apresentava melhor desenvolvimento folicular, para esta avaliação foi utilizada uma agulha de Verres para a mensuração do tamanho de cada folículo (Ballarotti, 2009). Ao final da IA, em cada fêmea, repetiu-se a aplicação de 225 UI de hCG

(gonadotropina coriônica humana, Chorulon 1000®, Intervet, São Paulo - SP) para indução da ovulação.

Nos momentos de implante do etonogestrel, remoção, estimulação ovariana e inseminação artificial, as fêmeas de jaguatirica foram anestesiadas seguindo o protocolo descrito anteriormente.

5.6.1 AMOSTRAS FECAIS

Foram coletadas amostras fecais de cinco fêmeas. As coletas foram realizadas todos os dias, cinco vezes por semana, coletando assim as amostras frescas. As amostras fecais somente foram coletadas quando não apresentaram aspecto incomum como, por exemplo, fezes diarreicas. Posteriormente, depositadas em sacos plásticos do tipo *ziplock*, contendo o número do recinto, data e hora da coleta. As amostras então foram congeladas em *freezer* comum no Refugio Biológico Bela Vista, em temperatura de -20°C.

5.7.1 ANÁLISE DE METABÓLITOS FECAIS

As amostras fecais foram descongeladas a temperatura ambiente e processadas seguindo o protocolo utilizado por Silva (2009), modificado.

Foram analisadas 365 amostras de fezes para as fêmeas. Destas, 205 para Estrógenos, 160 para Progesterona.

O método consistiu em:

- Pesar $0,50 \pm 0,02$ g de fezes úmidas bem homogeneizadas e colocadas em tubos de ensaio identificados de acordo com o saco plástico utilizado para coleta;
- Adicionar 5 ml de metanol 90% (metanol PA 90; H₂O 10) a cada tubo;
- Os tubos contendo as soluções foram homogeneizados em um Vórtex por 15 minutos;
- As amostras então foram centrifugadas a 3500 RPM durante 15 minutos;
- Após a centrifugação foram recuperados 4 ml do sobrenadante e acondicionados em dois tubos de 2 ml.

As extrações foram realizadas no Laboratório de Parasitologia do Hospital Veterinário da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR Campus de Toledo, posteriormente o material já extraído, foi levado ao Laboratório Álvaro (Cascavel – PR), para a realização do ensaio imunoenzimático (EIA).

Os extratos foram então diluídos em solução tampão *Pink PBS (phosphate buffer saline)* pH 7,4.

Na fase de leitura foram utilizadas placas comerciais para Estradiol (DRG® *Estradiol* ELISA (EIA-2693)) e Progesterona (DRG® *Progesterone* ELISA (EIA-1561)). Estes kits comerciais foram utilizados para dosagens hormonais fecais em chitas (*Acinonyx jubatus*) por Borque *et al.*, (2005).

Protocolo para leitura de estradiol (fornecido pelo fabricante):

- 1 – Colocar 25 µl de calibrador, controles e amostras, consecutivamente em cada poço da placa;
- 2 – Incubar por 5 min. a temperatura ambiente (entre 18 e 22° C);
- 3 – Adicionar 200 µl do conjugado enzimático em cada cavidade preenchida;
- 4 – Incubar por 120 min. (2hrs) a temperatura ambiente;
- 5 – Homogeneizar bem os poços (10 seg.);
- 6 – Lavar por três vezes cada poço contendo as amostras;
- 7 – Adicionar 100 µl de substrato em cada poço;
- 8 – Incubar por 15 min. em temperatura ambiente;
- 9 – Parar a reação enzimática adicionando 50 µl de solução de parada em cada poço;
- 10 – Determinar a faixa de absorbância em 450±10 nm na leitora de microplaca;

Protocolo para leitura de progesterona (fornecido pelo fabricante):

- 1 – Colocar 25 µl de calibrador, controles e amostras, consecutivamente em cada poço da placa;
- 2 – Incubar por 5 min. a temperatura ambiente (entre 18 e 22° C);
- 3 – Adicionar 200 µl do conjugado enzimático em cada cavidade preenchida;
- 4 – Incubar por 60 min. a temperatura ambiente;
- 5 – Homogeneizar bem os poços (10 seg.);
- 6 – Lavar por três vezes cada poço contendo amostras;
- 7 – Adicionar 200 µl de substrato em cada poço;
- 8 – Incubar por 15 min. a temperatura ambiente;

9 – Parar a reação enzimática adicionando 100 µl de solução de parada em cada poço;

10 – Determinar a faixa de absorbância em 450 ± 10 nm na leitora de microplaca;

É recomendada a leitura das células até 10 min. após a adição da solução de parada para ambos os ensaios.

A diluição utilizada para ambos os hormônios foi de 1:5. O coeficiente de variação (CV) dos padrões comparando cada ponto da curva padrão entre os ensaios foi de 5,67% para estradiol, e de 7,72% para progesterona. O CV intra-ensaio foi de 9,45% para estradiol e 6,48% para progesterona. Segundo Moreira (2001), o CV deve ser inferior a 10%, indicando homogeneidade e consistência das leituras.

4.8.1 ANÁLISE DE DADOS

Após o término das leituras, foram elaborados gráficos com os valores correspondentes às concentrações de metabólitos de estrógenos (ng/g) e progestágenos (µg/g) de fezes úmidas. Os gráficos foram elaborados no programa Microsoft Office Excel® 2007.

As análises compreenderam três fases, Normal contendo 30 dias, Implante com 30 dias e Após Inseminação Artificial também com 30 dias, totalizando 90 dias.

Uma das fêmeas foi utilizada como padrão para comparação de ciclo estral.

As comparações estatísticas foram elaboradas comparando a fase inicial (Normal – 30 dias) e fase com implante (30 dias) tanto para estrógenos quanto progestágenos.

Foram calculados os valores (média \pm erro padrão da média) para os níveis basais de estrógenos e progestágenos, para cada fêmea foi realizado um processo iterativo em que os valores que excederam a média mais 2,0 desvios padrões (DP) foram excluídos. A média então foi recalculada e o processo de eliminação foi repetido até que nenhum valor excedesse a média + 2,0 DP. O valor mais alto entre um grupo de concentrações altas (que excederam a média mais 2,0 DV) foram considerados como picos (Brown *et al.*, 1996, Morais *et al.*, 1996, Songsasen *et al.*, 2006). O cálculo de nível basal foi realizado para cada indivíduo, para cada etapa do experimento a ser analisado.

Os resultados das leituras não apresentam uma distribuição normal, portanto foi empregado o Teste de Mann-Witney-Wilcoxon (não paramétrico para dois grupos de amostras independentes) para comparar as fases do experimento de um mesmo indivíduo.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1.1. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA OVARIANA POR VIDEOLAPAROSCOPIA

Durante o procedimento de inseminação artificial a videolaparoscopia identificou resposta ovariana consistente em todas as fêmeas, com observação de ovários direito e esquerdo apresentando dois a quatro folículos maduros, com 1 a 2 mm de diâmetro cada (Tabela II), mensurados pela agulha de Verres, que possui 1 mm em sua extremidade distal.

Estas observações caracterizaram a eficácia do protocolo na indução da foliculogênese. Não foram evidenciados corpos lúteos nos ovários.

O corno uterino foi escolhido levando em consideração o maior número de folículos maduros, e seus respectivos diâmetros, estes representados na Tabela 2. Para as fêmeas Lp 2322, Lp 2417 e Lp 2428 a resposta ovariana foi melhor no ovário esquerdo, apresentando mais folículos e com tamanhos maiores em relação ao ovário direito, somente a fêmea Lp 1897 apresentou em ambos os ovários apenas um folículo e estes com diâmetro de aproximadamente 1mm.

Todas as fêmeas apresentaram útero túrgido.

Tabela 2 - Resposta ovariana ao protocolo de indução ovariana por visualização através de videolaparoscopia.

Fêmea	Ovário direito	Ovário esquerdo	Útero	Corpo lúteo
LP 2322	1 folículo 2 mm	1 corpo hemorrágico 2 folículos 2 mm	Túrgido	Ausente
LP 1897	1 folículo 1 mm	1 folículo 1 mm	Túrgido	Ausente
LP 2417	3 folículos > 1 mm	4 folículos 2 mm	Túrgido	Ausente
LP 2428	2 folículos 1 mm 1 folículo 2 mm	3 folículos 2 mm	Túrgido	Ausente

Pelican (2004) demonstrou que ovários com vários e recentes pontos de ovulação, resultam nos melhores resultados de prenhez para gatas domésticas, ocasionando a presença de múltiplos folículos ou recentes ovulações no ato da inseminação artificial. Recentes pesquisas em felídeos indicaram que fêmeas com a presença de Corpo Lúteo maduro no momento da inseminação artificial não atingem

a prenhez (Pelican *et al.*, 2008; Balarotti, 2009). Segundo Balarotti, 2009, a utilização do implante de etonogestrel (Implanon[®], Organon do Brasil Indústria e Comércio, São Paulo - SP) possibilita a obtenção de um grande número de folículos, uma vez que os ovários encontram-se no estado quiescente no início do protocolo de indução, comprovando que as fêmeas apresentam uma resposta mais uniforme ao protocolo de indução ovariana.

6.2.1. DOSAGENS HORMONAIS

As concentrações médias de estrógenos e progestágenos e seus consecutivos erros-padrão estão representados na Tabela 3. Visualmente ocorreu uma redução significativa nos valores de estrógenos na fase Implante, com exceção da fêmea Lp 2428, a qual apresentou um aumento nas concentrações fecais de estrógenos. Para as concentrações de progesterona, duas (Lp 2322 e Lp 2417) das fêmeas apresentaram uma diminuição e duas (Lp 1897 e Lp 2428) apresentaram um aumento (Tabela 3). Estas reduções, principalmente em relação aos metabólitos de estradiol, pode ser um indício de que o uso do etonogestrel é eficiente para reduzir a atividade ovariana durante o período do implante.

Tabela 3 - Médias das concentrações de metabólitos fecais de estradiol e progesterona, antes, durante e após o protocolo hormonal para inseminação artificial (IA), com ênfase para a fase anterior e com implante de etonogestrel.

Média (± erro-padrão) de metabólitos de estrógenos (ng/g) nas três fases do experimento				
	Lp 2322	Lp 1897	Lp 2417	Lp 2428
Normal	2169,25 ± 1075,70	3288,80 ± 1146,11	508,59 ± 101,80	1128,12 ± 515,90
Implante	341,82 ± 71,26	651,81 ± 186,53	275,71 ± 68,13	1517,99 ± 774,65
Após IA	1214,24 ± 616,80	476,62 ± 189,89	2531,93 ± 1448,80	1953,99 ± 1043,94
Valor de p	0,1643	0,0325*	0,0812	0,7524
Média (± erro-padrão) de metabólitos de progestágenos (µg/g) nas três fases do experimento				
	Lp 2322	Lp 1897	Lp 2417	Lp 2428
Normal	7,93 ± 2,95	4,51 ± 0,93	6,41 ± 1,25	3,44 ± 0,89
Implante	6,40 ± 2,84	8,87 ± 4,67	5,04 ± 1,35	22,59 ± 14,65
Após IA	49,39 ± 22,80	26,19 ± 9,19	44,20 ± 12,83	66,13 ± 33,17
Valor de p	0,6497	0,6494	0,3314	0,2312

Valores de p referentes à comparação entre as variáveis Normal e Implante;

*Valores (p<0,05) indicam diferença significativa entre as fases.

Os resultados das dosagens hormonais fecais estão demonstradas nas Figuras 7 a 11. A fêmea Lp 2029 não foi submetida ao protocolo de inseminação artificial, sendo representada (Figura 7) como um padrão para as demais fêmeas do experimento.

Na Figura 7 observa-se que a duração do ciclo estral, sendo calculada como o intervalo entre picos consecutivos de estrógeno, foi similar à citada por Moreira *et al.*, (2001), que demonstra uma faixa de variação de 7 a 51 dias. A duração do estro (representado pelo número de dias em que as concentrações de estrógeno fecal ficam elevadas) variou de 1 a 6 dias, sendo similar entre as espécies do gênero *Leopardus* (Moreira, 2001).

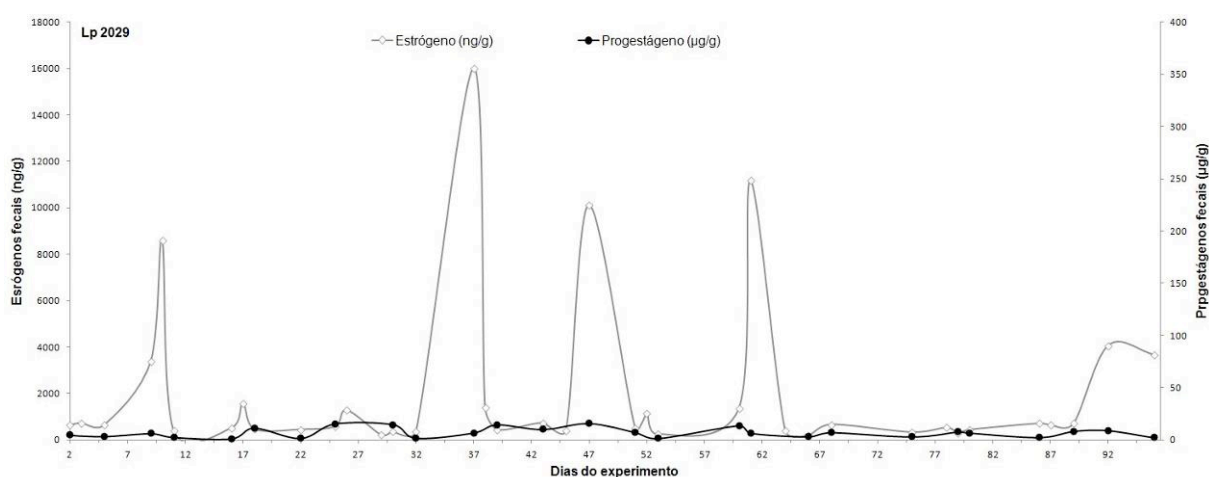


Figura 7. Perfis de estrógenos (ng/g) e progestágenos (µg/g) fecais em uma fêmea controle (Lp 2029) de jaguatirica (*L. pardalis*) não submetida ao protocolo de inseminação artificial.

Segundo Moreira *et al.*, (2001), as jaguatiricas não apresentam sazonalidade reprodutiva, apresentando ciclo ovariano normal durante todos os meses do ano. Foi relatada a ocorrência de nascimentos de filhotes de jaguatirica no CASIB em todos os meses do ano (Moreira, 2001).

A fêmea Lp 1897 foi submetida ao protocolo de inseminação artificial, seu perfil de metabólitos fecais está representado na Figura 8, apresenta dois picos de estradiol anterior ao implante de etonogestrel. Houve uma queda nas concentrações de estrógenos fecais após o implante, sendo comprovada estatisticamente ($p=0,0325$) demonstrada na Tabela 3 e na Figura 12. Após o protocolo de inseminação artificial, não houve um aumento significativo nas médias de

estrógenos, ocorrendo somente um pico e este muito reduzido em relação aos observados anteriormente ao uso do implante.

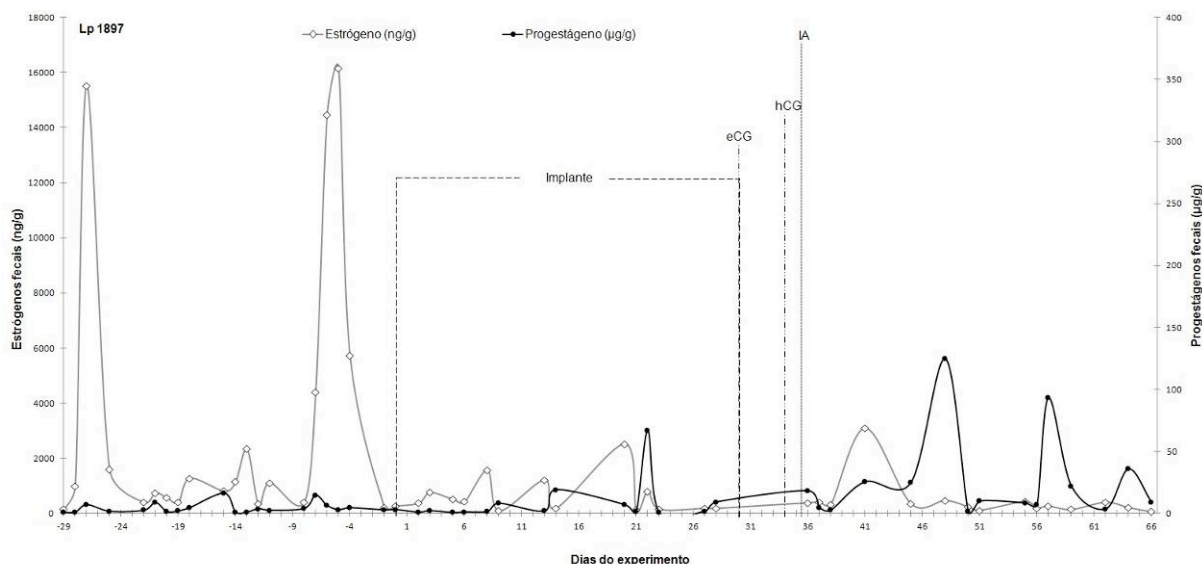


Figura 8. Perfis de metabólitos de estrógenos (ng/g) e progestágenos (µg/g) para a fêmea Lp 1897, antes, durante e após o protocolo de inseminação artificial.

A fêmea Lp 2322 apresentou em seu perfil de metabólitos fecais (Figura 9), dois picos acentuados de metabólitos fecais de estradiol anteriores ao implante, porém são picos desuniformes. Ocorreu uma visível queda nas concentrações de estrógenos fecais após o implante, porém esta queda não foi comprovada estatisticamente ($p=0,1643$) apresentada na Tabela 3 e na Figura 12. Após o protocolo de inseminação artificial, ocorreu um aumento significativo nas médias de estrógenos, apresentando dois picos, estes reduzidos e desuniformes, assim como os observados anteriormente ao uso do implante.

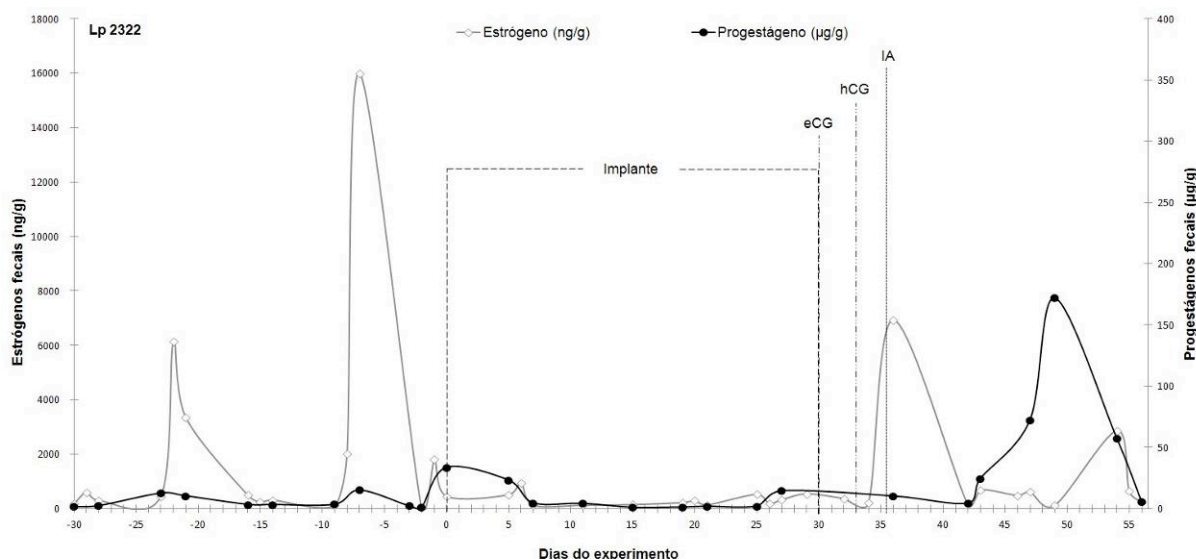


Figura 9. Perfil de metabólitos de estrógenos (ng/g) e progestágenos (µg/g) para a fêmea Lp 2322, antes, durante e após o protocolo de Inseminação artificial.

A fêmea Lp 2417 não apresentou em seu perfil de metabólitos fecais (Figura 10) picos acentuados de estrógenos anteriores ao implante. A Tabela 3 e Figura 12 apresentam uma diferença nas concentrações de estrógenos fecais após o implante, sendo a média do implante menor que a normal, porém esta diferença não foi comprovada estatisticamente ($p=0,0812$). Após o protocolo de inseminação artificial, ocorreu um aumento significativo nas médias de estrógenos, apresentando um pico logo após a inseminação artificial.

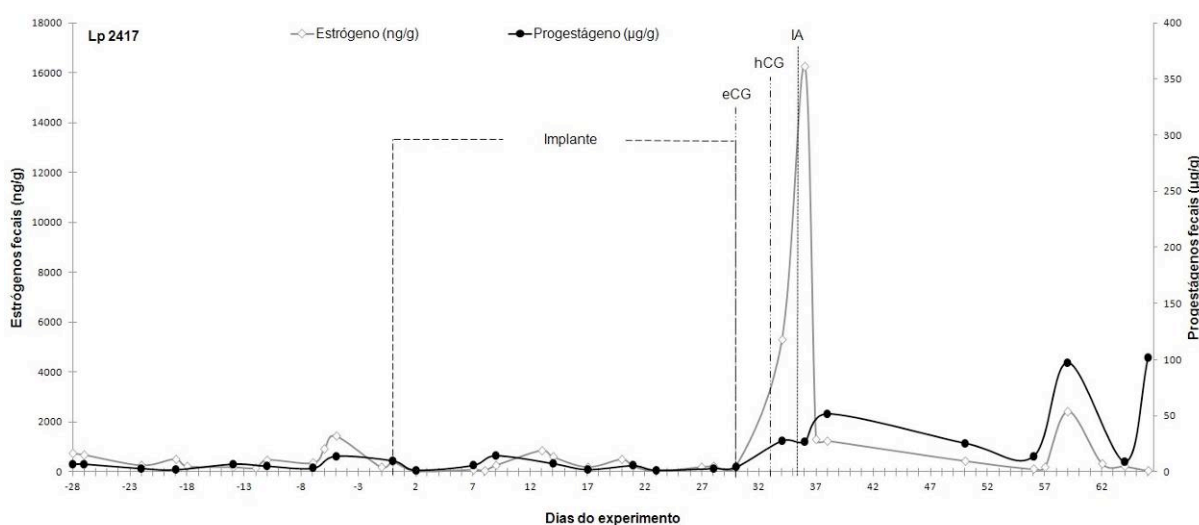


Figura 10. Perfil de metabólitos de estrógenos (ng/g) e progestágenos (µg/g) para a fêmea Lp 2417, antes, durante e após o protocolo de Inseminação artificial.

A última fêmea do experimento, Lp 2428, apresentou em seu perfil de metabólitos fecais (Figura 11) dois picos baixos de estradiol anteriores ao implante. Após o implante ocorreu o aumento das concentrações de estrógenos fecais, ocasionado por um pico maior que o da primeira fase, de certa forma, o oposto ao esperado (Figura 13). Mesmo com este aumento súbito nas médias, não foi comprovada uma diferença estatística ($p=0,7524$) entre as duas fases. Após o protocolo de inseminação artificial, ocorreu um aumento nas médias de estrógenos fecais (Tabela 3), apresentando um pico acentuado logo após a inseminação artificial.

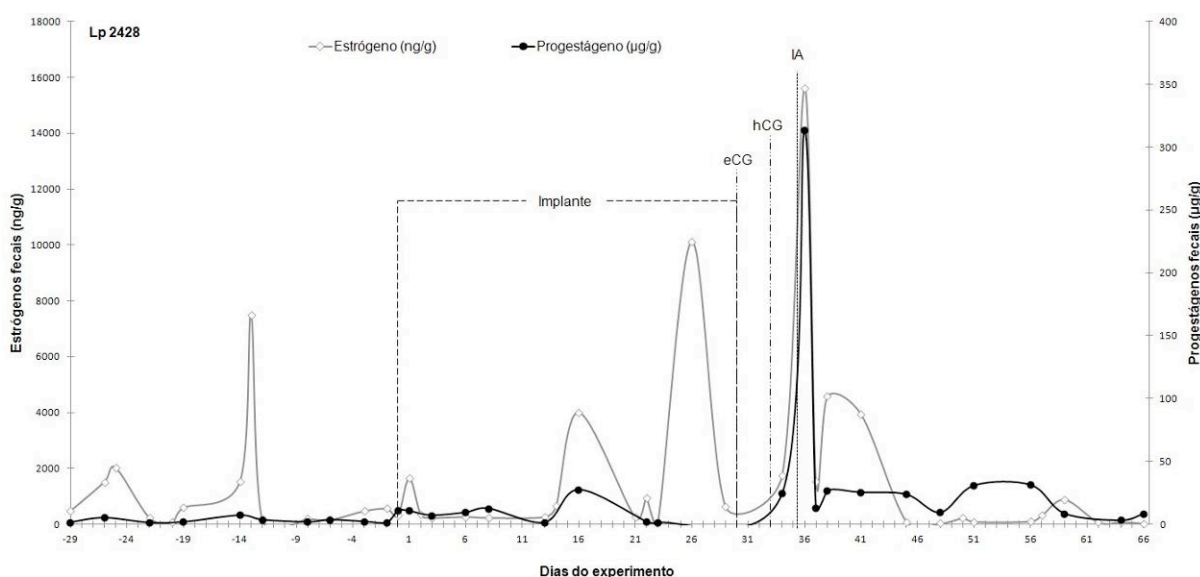


Figura 11. Perfil de metabólitos de estrógenos (ng/g) e progestágenos (µg/g) para a fêmea Lp 2428, antes, durante e após o protocolo de Inseminação artificial.

Os gráficos de uma maneira geral apresentam uma visível redução nas concentrações hormonais quando comparamos a fase normal e a fase com implante, com exceção da fêmea Lp 2428, a qual apresentou um aumento entre a primeira e a segunda fase. As fêmeas, Lp 1897 e Lp 2322 não apresentaram picos hormonais regulares logo após o início da aplicação do eCG, este fato pode induzir que etonogestrel, pode ter provocado uma redução hormonal excessiva ou prolongada (mesmo com a retirada do implante).

Segundo o fabricante o tempo para ser metabolizado o hormônio em humanos é em torno de 25 horas, sendo assim o protocolo de retirada do hormônio

e a injeção de eCG em seguida, podendo ser potencialmente prejudicial à tentativa de reprodução para fêmeas de jaguatirica.

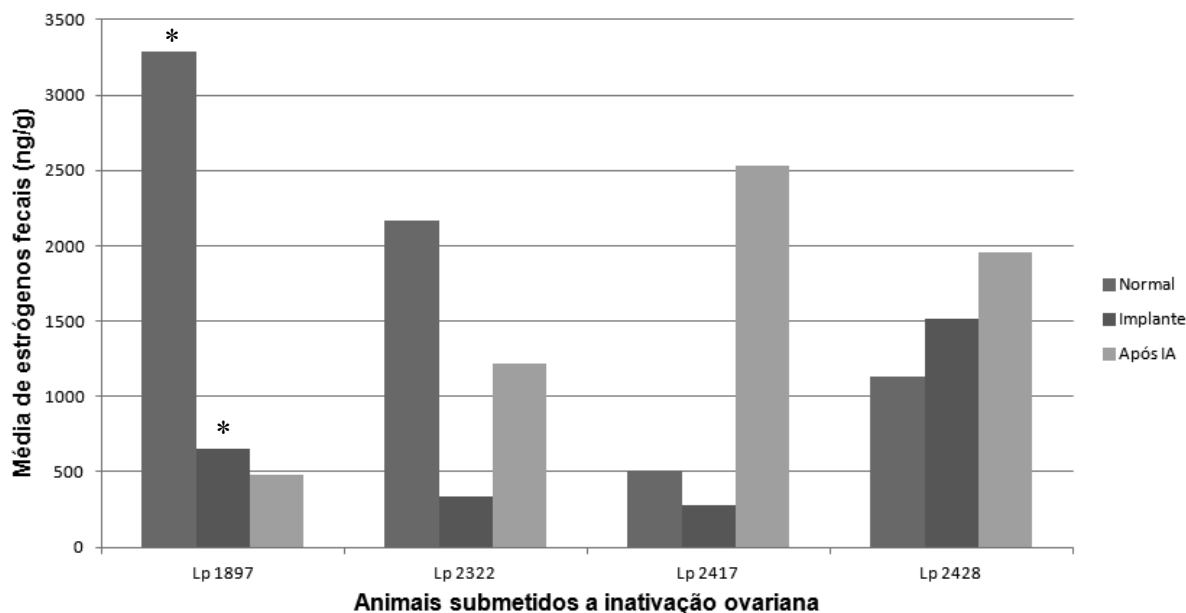


Figura 12 Representação gráfica das diferenças entre médias de estrógenos com ênfase entra a fase normal e a implantada. *Representa diferença significativa entre as fases para $p > 0,05$.

Novos estudos são recomendados a fim de testar diferentes tempos entre a retirada do implante e o início do protocolo de estimulação ovariana, procurando assim estabelecer um tempo ideal para a inseminação.

Balarotti (2009) demonstrou que o implante de etonorgestrel é eficiente para diminuir as concentrações de estradiol, levando à inatividade ovariana e à total ausência de picos. Para Mccann e Potter (1994), contraceptivos contendo progestágenos agem inibindo a ação de gonadotropinas sobre o hipotálamo e a hipófise. Impedindo a liberação de LH e FSH não ocorre a ovulação, consequentemente não há presença de corpo lúteo, mantendo assim as concentrações de progesterona baixas. Assim a ausência de um pico de LH, anterior a ovulação, determina a supressão efetiva no desenvolvimento folicular e consequentemente nas taxas de estradiol no organismo.

Para Balarotti (2009), o Implanon causa a ausência de ovulação, sugerindo assim que o etonogestrel impeça picos de LH.

Pelican *et al.*, (2006) demonstraram a efetividade e o longo tempo de ação dos hormônios eCG e hCG no estímulo à ovulação, podendo causar muitas vezes uma segunda onda de crescimento folicular, isso afeta a capacidade de prenhez das

fêmeas (Pelican, 2004). A fêmea Lp 2428 (Figura 11) apresentou uma onda folicular após a administração das gonadotropinas.

Segundo Silva (2009), o protocolo de 80-84 horas foi comparado a protocolos mais longos e apresentou o melhor resultado, sendo testado em gato doméstico no início da década de 90. Nos anos seguintes foi aplicado por vários pesquisadores, a partir de então vem sendo aplicado com sucesso na reprodução de espécies de felídeos silvestres.

Quando levamos em consideração os metabólitos fecais de estrógenos, pode-se verificar uma redução nas médias gerais e dos erros padrão entre as fases Normal e Implante, com exceção da fêmea Lp 2428 (Figuras 13 a 16), que se mostrou atípica em relação aos demais animais do experimento. Uma redução semelhante foi observada por Silva (2009), onde após o tratamento com progestina via oral ela observou uma redução das médias gerais individuais das fêmeas. Isso deve indicar que o implante de etonorgestrel anteriormente à injeção de eCG reduziu a ocorrência de altos valores de estrógenos, características de hiperestrogenismo. Do mesmo modo, ocorreu a redução dos erros padrão das amostras, indicativo de um comportamento hormonal mais homogêneo e consistente.

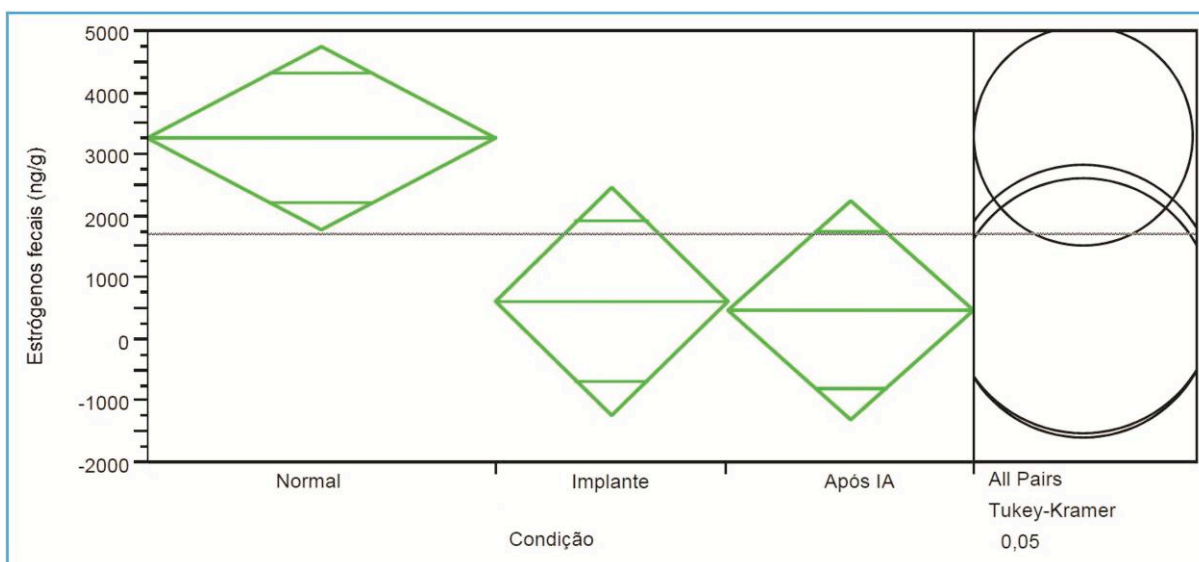


Figura 13. Médias e erros-padrão das concentrações de metabólitos de estrógenos entre as fases do estudo para a fêmea Lp 1897. O gráfico demonstra diferença entre Normal e Implante (0,0048).

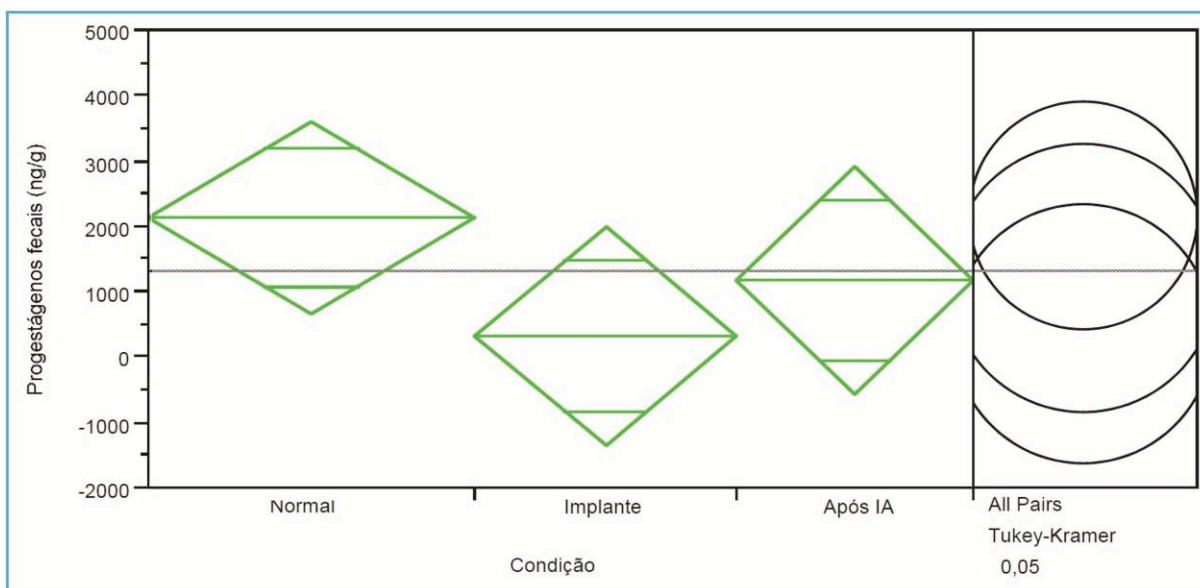


Figura 14. Médias e erros-padrão das concentrações de metabólitos de estrógenos entre as fases do estudo para a fêmea Lp 2322. Apesar de apresentar diferença no gráfico entre Normal e Implante, o teste indica igualdade ($p=0,2771$) entre as fases ($p>0,05$).

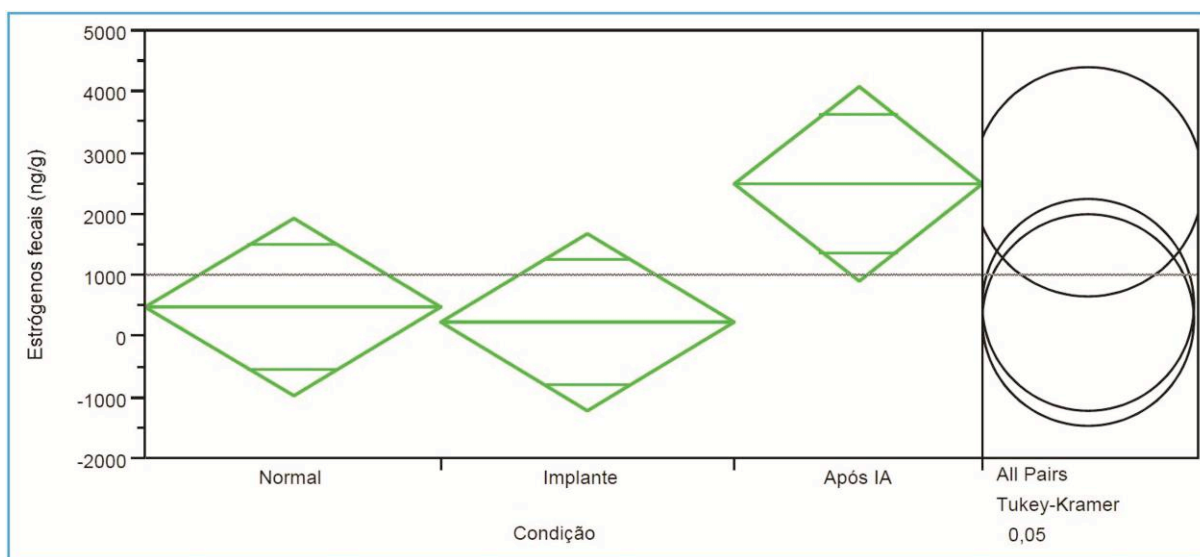


Figura 15. Médias e erros-padrão das concentrações de metabólitos de estrógenos entre as fases do estudo para a fêmea Lp 2417. Indica a igualdade entre as fases ($p=0,1280$) ($p>0,05$).

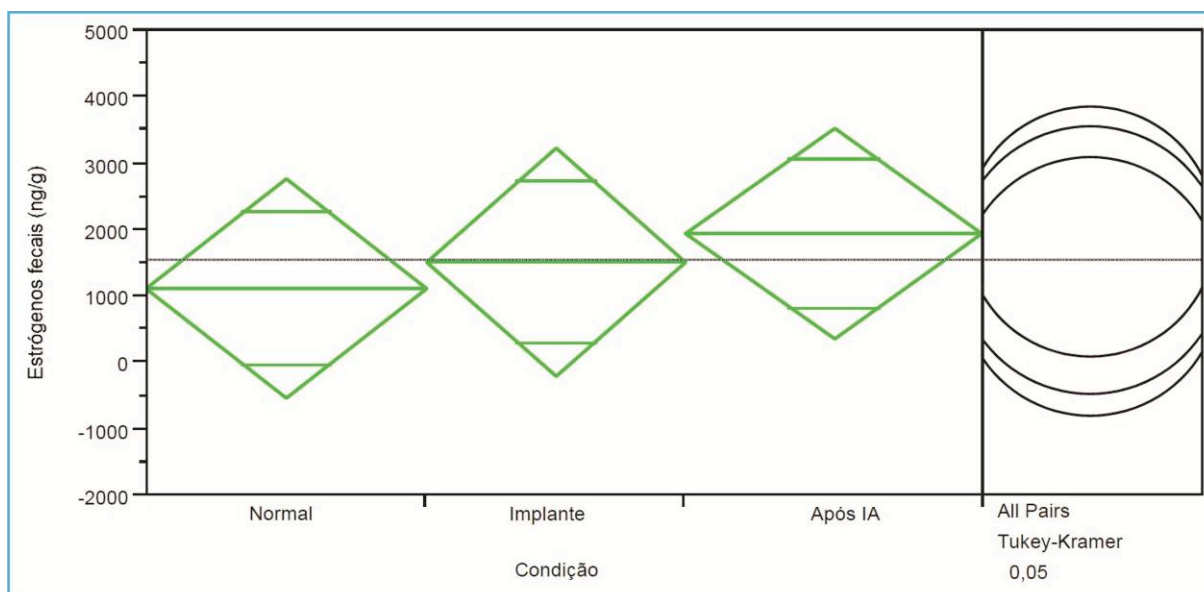


Figura 16. Médias e erros-padrão das concentrações de metabólitos de estrógenos entre as fases do estudo para a fêmea Lp 2428. Demonstrando que não há diferença significativa ($p=0,5895$) entre as médias ($p>0,05$).

Para os metabólitos fecais de progesterona observamos que não ocorreram diferenças estatísticas entre a fase Normal e Implante. Para a fêmea Lp 2029, não foi observada nenhuma elevação nas concentrações de progestágenos fecais. De modo geral as fêmeas não apresentaram picos de progesterona durante o período do implante, com exceção da fêmea 2428 que teve um leve aumento nas concentrações, este fato é responsável pela igualdade das médias entre a fase do Implante e a fase Após IA (inseminação artificial). Para as demais fêmeas, todas apresentaram diferenças estatísticas entre estas fases (Tabela 4) (Figuras 17 a 21).

Tabela 4 - Médias das concentrações de metabólitos fecais de progesterona, durante a fase de implante e após o protocolo de inseminação artificial (IA), valores com * indicam diferença ($p<0,05$) significativa entre fases.

Média e erro-padrão de progestágenos nas fases Implante e Após IA do experimento				
	Lp 1897	Lp 2322	Lp 2417	Lp 2428
Implante	$8,87 \pm 4,67$	$6,40 \pm 2,84$	$5,04 \pm 1,35$	$22,59 \pm 14,65$
Após IA	$26,19 \pm 9,19$	$49,39 \pm 22,80$	$44,20 \pm 12,83$	$66,13 \pm 33,17$
Valor de p	0,0177*	0,0083*	0,0013*	0,1325

*Valores ($p<0,05$) indicam diferença significante entre as fases.

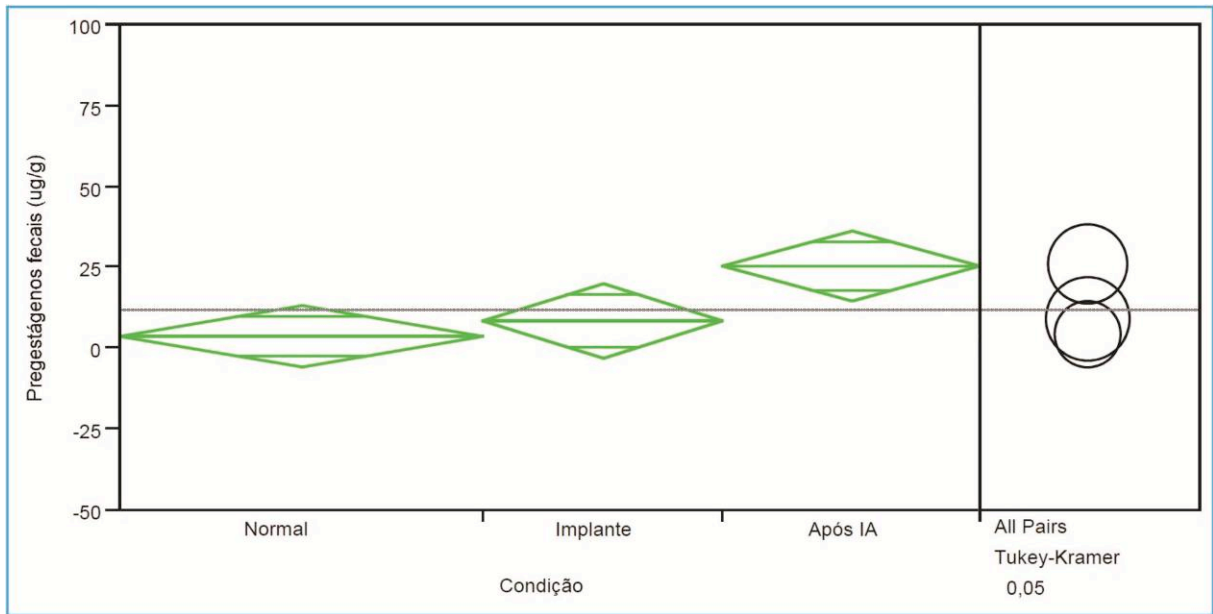


Figura 17. Médias e erros-padrão das concentrações de metabólitos de progestágenos entre as fases do estudo para a fêmea Lp 1897. O gráfico demonstra diferença entre Implante e Após IA (0,0177).

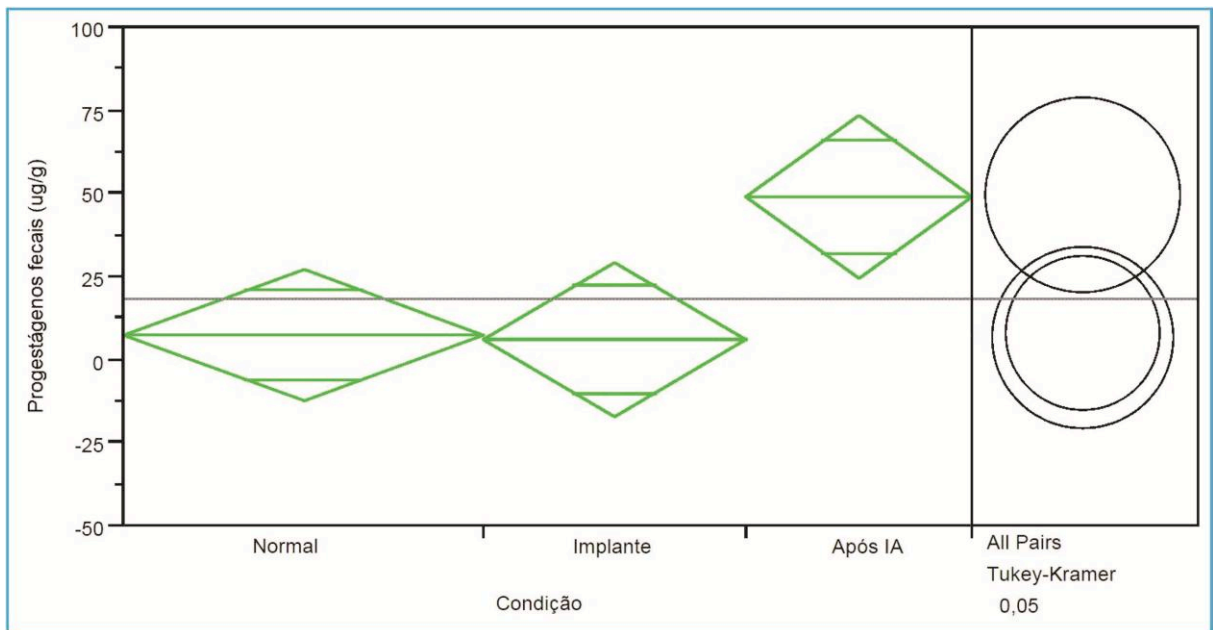


Figura 18. Médias e erros-padrão das concentrações de metabólitos de progestágenos entre as fases do estudo para a fêmea Lp 2322. O gráfico demonstra diferença entre Implante e Após IA (0,0083).

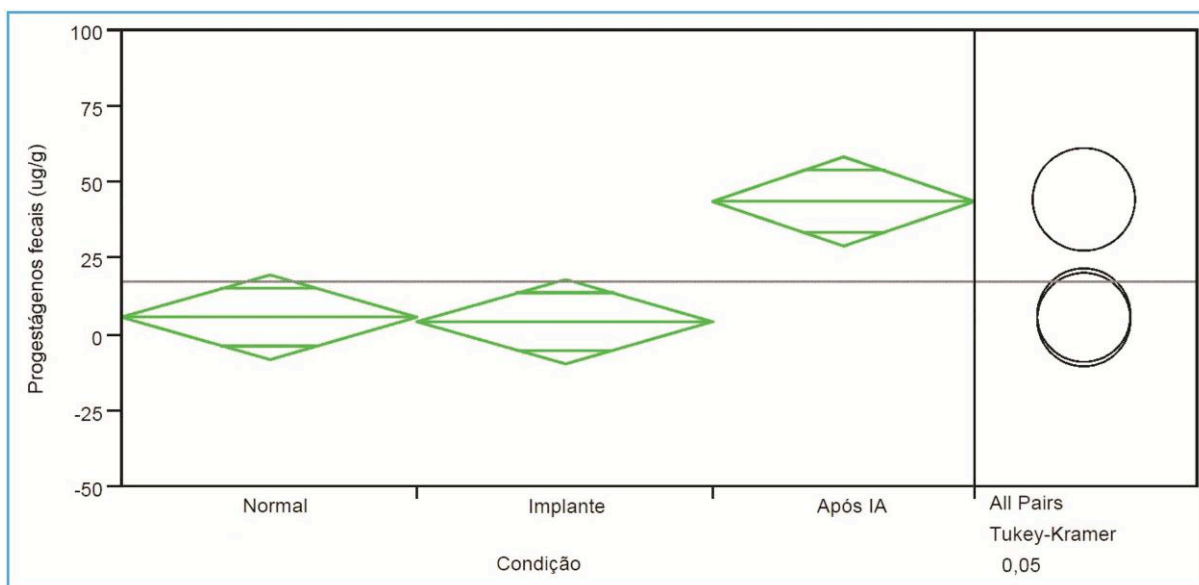


Figura 19. Médias e erros-padrão das concentrações de metabólitos de progestágenos entre as fases do estudo para a fêmea Lp 2417. O gráfico demonstra diferença entre Implante e Após IA (0,0013).

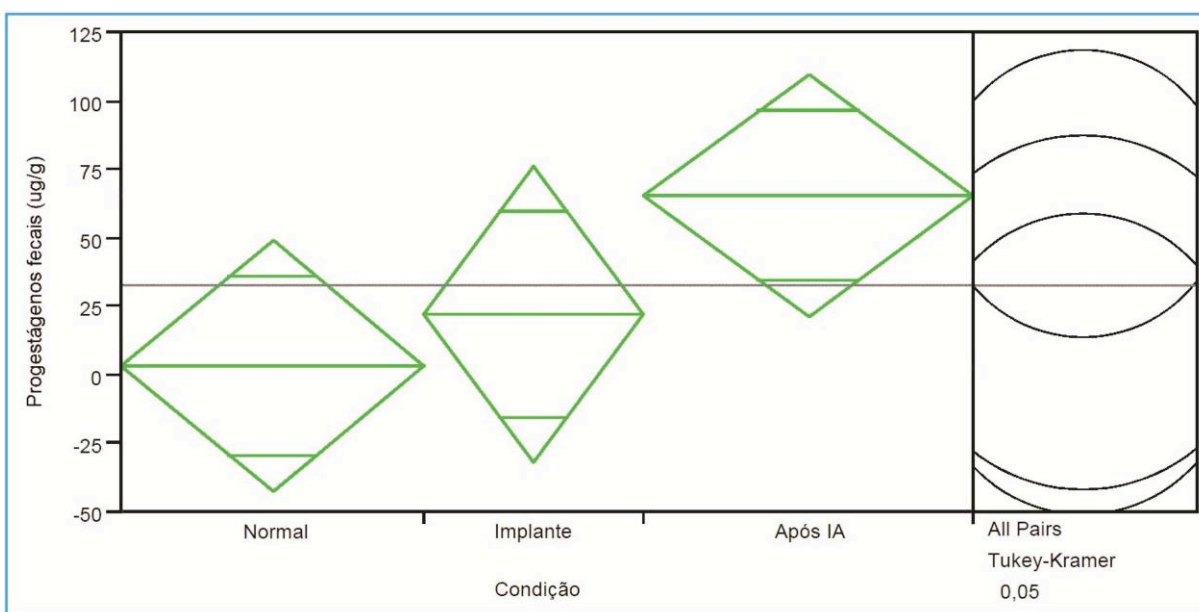


Figura 20. Médias e erros-padrão das concentrações de metabólitos de progestágenos entre as fases do estudo para a fêmea Lp 2417. Demonstrando que não há diferença significativa ($p=0,1325$) entre as médias ($p>0,05$).

As concentrações basais de metabólitos de progestágenos foram calculadas, partindo dos valores que precediam as ondas de estrógeno pré-ovulatórias e em seguida retornando aos valores basais. Somente foram considerados aumentos pós-ovulatórios para excreção de metabólitos fecais de progestágenos os valores que excederam a média + dois desvios padrões e os quais se mantiveram altos por no mínimo duas semanas (Moreira, 2001). Assim somente as fêmeas Lp 1897 e Lp 2417 apresentaram quadros de ovulação, os

demais picos não são precedidos por ondas de estrógenos ou são curtas com média de três dias.

Na Tabela 5 é possível observar a linha basal média dos animais do experimento, Segundo Moreira (2001), os cálculos para determinação dos níveis basais de estrógeno e progestágenos devem ser realizados de forma individual, deve-se levar em consideração que cada animal possui um limiar diferente, ou seja, fêmeas da mesma espécie podem apresentar sinais de estro em diferentes níveis de estrógeno, ainda podendo ocorrer variação no indivíduo, tendo influências ambientais.

Tabela 5 - Concentração basal (média \pm EPM) de metabólitos fecais de estrógenos e progestágenos, por fêmea, para as jaguatiricas do experimento

Fêmea	Estrógenos fecais			Progestágenos fecais		
	Média	\pm	EPM	Média	\pm	EPM
LP 2029	480,63	\pm	32,62	6,75	\pm	0,92
LP 1897	283,83	\pm	23,50	1,81	\pm	0,31
LP 2322	331,19	\pm	34,31	2,64	\pm	0,75
LP 2417	605,64	\pm	156,99	6,31	\pm	0,93
LP 2428	175,88	\pm	22,37	4,96	\pm	0,81

Quando comparamos as médias basais somente de cada fase, Normal e Implante, é possível observar na Figura 17 que as médias de todas as fêmeas para as concentrações basais de metabólitos de estradiol, após o implante são estatisticamente diferentes ($p=0,0051$) entre as duas fases do experimento. Isso demonstra matematicamente que o implante de etonorgestrel, de uma forma geral, foi eficaz na redução as concentrações de estradiol antes do processo da administração das gonadotropinas exógenas.

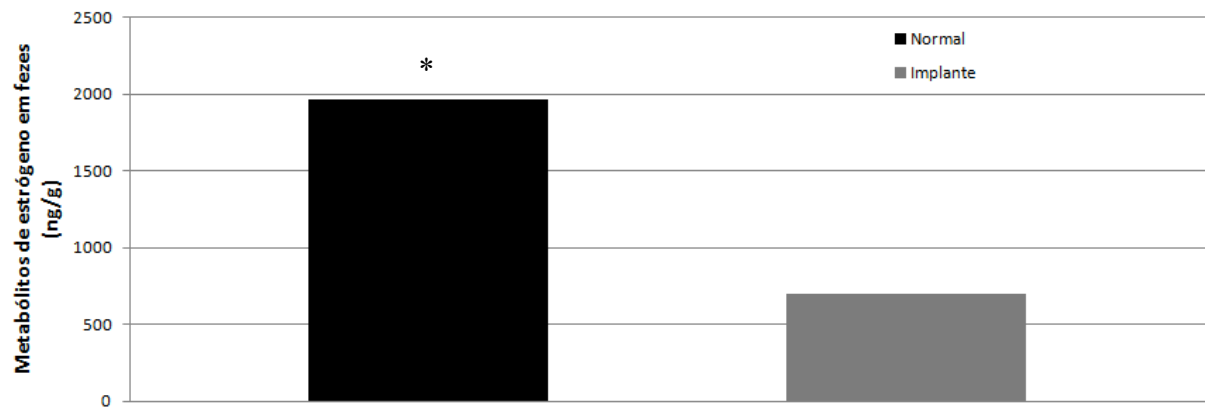


Figura 21. Médias das concentrações basais de metabólitos de estrógenos entre a fase normal e Implante. * Demonstrando diferença significativa entre as médias ($p=0,0051$) ($p<0,05$).

7. CONCLUSÕES

1. O Implante de etonorgestrel (68 mg / implante / 30 dias) reduz a atividade ovariana em fêmeas de jaguatirica, mostrando-se eficaz para uso em programas de inseminação artificial;
2. Ocorreu uma visível redução das médias de concentrações de estrógenos, sugerindo que quadros de hiperestrogenismo não ocorreram;
3. Ocorreu uma redução no desvio padrão dos valores de estrógeno, sugerindo que houve uma resposta mais homogêneas em relação à flutuação hormonal da fase anterior à aplicação de gonadotropinas exógenas;
4. Os kits comerciais se mostraram eficientes para dosagens hormonais em fêmeas de jaguatirica (*L. pardalis*), sendo uma opção para dosagens rápidas em programas de reprodução assistida.

8. REFERÊNCIAS

- ABBOT, D. H. & HEARN, J. P. Physical, hormonal and behavioral aspects of sexual development in the Marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.53, p.155-166, 1978.
- BALLAROTTI, D. T. **Avaliação de protocolos para indução de inatividade ovariana em gatas domésticas**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.
- BALLAROTTI, D. T.; MORAES, W.; OLIVEIRA, C. A.; FELIPPE, É. C.; MOREIRA, N. **Avaliação de protocolos para indução de inatividade ovariana em gatas domésticas**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v.46, n.6, p.465-473, 2009.
- BLANCO, M. B. & MEYER, J. S. Assessing reproductive profiles in female brown mouse lemurs (*Microcebus rufus*) from Ranomafana National Park, Southeast Madagascar, using fecal hormone analysis. **American Journal of Primatology**, v.71 p.439-446, 2009.
- BORQUE, C.; PEREZ-GARNELO, S. S.; LOPEZ, M.; TALAVERA, C.; DELCLAUX, M.; DE LA FUENTE, J. Validating a commercially available enzyme immunoassay for the determination of 17 β -estradiol and progestogens in the feces of cheetahs (*Acinonyx jubatus*): A case report. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.36, n1, p.54-61. 2005.
- BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; WIELEBNOWSKI, N.; GOODROWE, K. L.; GRAHAM, L. H.; WELLS, S.; HOWARD, J. G. Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. **J Reprod Fertil**, v.106, n1. p.337-46. 1996.
- BROWN, J. L. Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. **Theriogenology**, v.66, n1. p.25–36, 2006.
- BROWN, J. L.; **Endocrine manual for hormonal assessment of wildlife species**. Endocrine Research Laboratory. Conservation & Research Center National Zoological Park, Front Royal, Virginia, 2008.
- CAMPBELL, C. J.; SHIDELER, S. E.; TODD, H. E.; LASLEY, B. L. Fecal analysis of ovarian cycle in female Black-Handed Spider Monkeys (*Atelles geoffroyi*). **American Journal of Primatology**, v.54, p.79-89, 2001.
- CASTRO, L. S. de. **Influências do enriquecimento no comportamento e nível de cortisol em felídeos silvestres**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
- EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the Neotropics**. University of Chicago Press, Chicago, 1999.

- EMMONS, L.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammals: a field guide**. University of Chicago Press, Chicago, 2nd ed. 1997.
- ERDMANN, R. H. **Exame reprodutivo, contenção farmacológica e criopreservação de sêmen em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.
- FUJITA, S.; SUGIURA, H.; MITSUNAGA, F.; SHIMIZU, K. Hormone profiles and reproductive characteristics in wild female japanese macaques (*Macaca fuscata*). **American Journal of Primatology**, v.64, p.367-375, 2004.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estados e municípios brasileiros**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acessado em: 05 dez. 2011
- LEWINSON, T.; PRADO, P. I. **Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento**. Ministério do Meio Ambiente, São Paulo, 2ª ed. 2004.
- MCCANN, M. F.; POTTER, L. S. Progestin-only contraception: a comprehensive review. **Contraception**, v. 50, Suppl. 1, p. 1-195, 1994.
- MAZZOLLI, M.; HAMMER, M. L. A.; Qualidade de ambiente para a onça-pintada, puma e jaguatirica na Baía de Guaratuba, Estado do Paraná, utilizando os aplicativos *Capture* e *Presence*. **Revista Biotemas**, v.21, n.2, p.105-117, 2008.
- MORAIS, R.N.; MOREIRA, N.; MORAES, W.; MUCCIOLO, R.G.; LACERDA, O; GOMES, M.L.F; SWANSON, W.F.; GRAHAM, L.H.; BROWN, J.L. Testicular and ovarian function in South American felids assessed by fecal steroid. **Proc. American Association Zoo Veterinarians**. P. 561-565, 1996.
- MOREIRA, N. **Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus***. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2001.
- MOREIRA, N.; BROWN, J. L.; MORAES, W.; SWANSON, W. F.; and MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Effect of housing and environmental enrichment on adrenocortical activity, behavior and reproductive cyclicity in the female tigrina (*Leopardus tigrinus*) and margay (*Leopardus wiedii*). **Zoo Biology**, n.26, p.441-460, 2007.
- MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; MORAES, W.; SWANSON, W. F.; GRAHAM, L. H.; PASQUALI, O. L.; GOMES, M. L. F.; MORAIS, R. N.; WILDT, D. E.; and BROWN, J. L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biology**, n.20, p.103-116, 2001.
- NASCIMENTO, H. E. M.; DIAS, A. da S.; TABANEZ, A. A. J.; VIANA, V. M. Estrutura e dinâmica de populações arbóreas de um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual na região de Piracicaba, SP. **Revista Brasileira de Biologia**, v.59, n.2, p.329-342, 1999.

- OLIVEIRA-ALVES, A.; PERES, M. C. L.; DIAS, M. A.; CAZAI-S-FERREIRA, G. da S.; SOUTO, L. R. A. Estudo das comunidades de aranhas (Arachnida: Araneae) em ambiente de Mata Atlântica no Parque Metropolitano de Pituáçu – PMP, Salvador, Bahia. **Biota Neotropica**, v.5, n.1a, 2005.
- PALME, R.; RETTENBACHER, S.; TOUMA, C. Stress hormones in mammals and birds: Comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1040, p.162-171, 2005.
- PELICAN, K. M. **Ovarian suppression with the progestin levonorgestrel but not the GnRH antagonist antide, induces a consistent response to exogenous gonadotropin in the domestic cat**. Thesis (Doctor) National Zoological Park, Smithsonian Institution, Washington, DC, 2004.
- PELICAN, K. M.; BROWN, J. L.; WILDT, D. E.; OTTINGER, M. A.; HOWARD, J. G. Short term suppression of follicular recruitment and spontaneous ovulation in the cat using levonorgestrel versus a GnRH antagonist. **General and Comparative Endocrinology**, v.144, p. 110–121, 2005.
- PELICAN, K.M.; WILDT, D.E.; OTTINGER, M.A.; HOWARD, J.G. Priming with progestin, but not GnRH antagonist, induces a consistent endocrine response to exogenous gonadotropins in induced and spontaneously ovulating cats. **Domestic Animals Endocrinology**, v.34, p.160–175, 2008.
- PELICAN, K. M.; WILDT, D. E.; PUKAZHENTHI, B.; HOWARD, J. G. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. **Theriogenology**, v.66, n.1, p.37-48, 2006.
- PEREIRA, R. J. G. Métodos não-invasivos para análises hormonais aplicadas aos estudos de ecologia e etologia. **R. Bras. Zootec.**, v.36, Suplemento especial, p.71-76, 2007.
- SILVA, T. M. R. **O uso de altrenogest para protocolos de reprodução assistida em gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.
- SONGSASEN, N.; RODDEN, M.; BROWN, J. L.; WILDT, D. E. Patterns of fecal gonadal hormone metabolites in the manged wolf (*Crhysocyon brachyurus*). **Theriogenology**, v.66, p.1743-1750, 2006.
- STONEHOUSE, B.; & ORR, R. **A visual introduction to wild cats**. New York: Checkmark Books, 1999.
- STRIER, K. B.; & ZIEGLER, T. E. Behavioral and endocrine characteristics of the reproductive cycle in wild Muriqui Monkeys, *Brachyteles arachnoides*. **American Journal of Primatology**, n.42 p.299-310, 1997.

- SWANSON, W. F.; BROWN, J. L. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.21-34, 2004.
- SWANSON, W. F.; MAGAREY, G. M.; HERRICK, J. R. Sperm cryopreservation in endangered felids: developing linkage of in situ-ex situ populations. **Soc Reprod Fertil Suppl**, n.65, p.417-32, 2007.
- TABARELLI, M.; MANTOVANI, W.; PERES, C. A. Effects of habitat fragmentation on plant guild structure in the montane Atlantic forest of southeastern Brazil. **Biological Conservation**, v.91, p.119–127, 1999.
- TOYONAGA, M.; SATO, Y.; SASAKI, A.; KAIHARA, A.; TSUTSUI, T.; Artificial insemination with cryopreserved sperm from feline epididymis stored at 4 °C. **Theriogenology** v.76 p.532–537, 2011.
- WILDT, D. E.; MONFORT, S. L.; DONOGHUE, A. M.; JOHNSTON, L. A.; HOWARD, J. Embryogenesis in conservation biology - or, how to make an endangered species embryo. **Theriogenology**, v.37, p.161-184, 1992.